

Die Bedeutung des osmotischen Gradienten
für den isotonen Resorptionsmechanismus
am proximalen Tubulus der Rattenniere

Ursula Müller

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555421_0004

Aus dem Physiologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr.med. Dr.med. h.c. K. Thureau

Die Bedeutung des osmotischen Gradienten für den
isotonen Resorptionsmechanismus am proximalen
Tubulus der Rattenniere

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ursula Müller
aus
Sonthofen

München
1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

1. Priv.Do. Dr. med. D.A. Häberle
2. Prof. Dr.med. A. Baethmann

Mitberichterstatter:

1. Prof. Dr.med. Dr.med.h.c. K. Thureau
2. Prof. Dr. med. J. Eigler

Dekan:

Prof. Dr.med. Dr.med.h.c. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.1988

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Methoden
 - 2.1. Versuchstiere und meßtechnische Vorrichtungen
 - 2.2. Versuchsaufbauten und statistische Methoden
3. Ergebnisse
 - 3.1. Transepitheliale Volumenfluxe und intraluminale Osmolaritäten
 - 3.2. Transepitheliale Potentialdifferenzen
 - 3.3. Transepitheliale Widerstände
4. Diskussion
 - 4.1. Befunde
 - 4.1.1. Elektrophysiologische Untersuchungen
 - 4.1.1.1. Messungen der transepithelialen Potentialdifferenz
 - 4.1.1.2. Messungen des Eingangswiderstands
 - 4.1.2. Flußmessungen und Messungen der Osmolaritäten
 - 4.2. Theoretische Schlußfolgerungen
 - 4.2.1. Der isotone Resorptionsmechanismus
 - 4.2.2. Integrative Funktion des "isotonen" Resorptionsmechanismus
 - 4.2.3. Der Chloridgradient als Triebkraft des Volumentransports
5. Zusammenfassung

- 6. Anhang
- 6.1. Tabellen und Berechnungen
 - 6.1.1. Volumenflußmessungen und Messungen der Osmolarität
 - 6.1.2. Potentialmessungen
 - 6.1.3. Widerstandsmessungen
 - 6.1.4. Berechnung der liquid-junction Potentiale
 - 6.1.5. Berechnung der Meßbrücke
 - 6.1.6. Berechnung der Diffusionspotentiale
 - 6.1.7. Abschätzung der Äquilibrierungsprozesse in Segment I
 - 6.1.8. Berechnung des transepithelialen Ohmschen Widerstands
 - 6.1.9. Berechnung der Natriumionen- und Chlorid-Permeabilität aus dem Ohmschen Epithelwiderstand
 - 6.1.10. Abschätzung der elektrisch leitenden parazellulären Porenfläche
 - 6.1.11. Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit des proximalen Tubulusepithels
- 6.2. Materialien
- 6.3. Verzeichnis der Abbildungen
- 7. Literaturverzeichnis

1.

Einleitung

Nach gegenwärtiger Auffassung (135, 141) erfolgt die Resorption von Elektrolyten und Wasser im proximalen Tubulusepithel der Warmblüterniere durch folgenden Mechanismus: über stoffwechselabhängige Transportprozesse werden Natrium- und Bicarbonationen vom Lumen in die basolateralen Spalten transloziert, so daß dort ein gegenüber dem Lumen und dem peritubulären Interstitium hypertoner Gradient aufgebaut wird. Im Sinne einer osmotischen Kopplung induzieren die akkumulierten Teilchen para- und transzelluläre Wasserflüsse. Zwei Mechanismen sollen dazu beitragen, daß das Resorbat nahezu isoton bleibt: Einmal ist nach dem augenblicklichen Wissensstand die hydraulische Leitfähigkeit, also die Wasserdurchlässigkeit, des proximalen Tubulusepithels als außerordentlich hoch anzunehmen, weswegen für die Aufrechterhaltung der transepithelialen Wasserflüsse relativ kleine osmotische Gradienten genügen. Daneben sollen die einmal induzierten Wasserflüsse einen weiteren Stimulus für die Resorption von Elektrolyten darstellen, ein Phänomen, das als solvent-drag Effekt bezeichnet wird und immerhin ein bis zwei Drittel des Nettoionenflusses tragen soll.

Physikalisch erklärt wird diese Rückwirkung der Wasserflüsse auf die Elektrolytresorption mit der hohen Durchlässigkeit der parazellulären tight-junction

Komplexe (Schlußleisten der Epithelzellen), weswegen ein Großteil der Wassermoleküle unter Umgehung des Intrazellulärtraumes in die basolateralen Spalten gelangen soll. Da die tight-junction Komplexe auch für Natrium- und Chloridionen hoch permeabel seien, erklärt sich, daß eine erhebliche Menge an gelöstem Natriumchlorid mitgeschwemmt wird (solvent-drag). Dagegen sei wegen der geringeren Durchlässigkeit für Bicarbonationen die solvent-drag Komponente für die Resorption dieser Ionenart anteilmäßig geringer. Quantifiziert wird diese Durchlässigkeit des Epithels für verschiedene Teilchen mit dem Reflexionskoeffizienten¹, der für Natrium- und Chloridionen etwa 0.5 bis 0.7 betragen soll (55).

Die Gültigkeit dieses Modells der "isotonen Resorption" über sogenannte leaky-Epithelien wie dem proximalen Tubulusepithel wird sich bemessen an der Größe der parazellulären Wasserflüsse und deren Rückkopplung auf den Elektrolyttransport. Sollte sich herausstellen, daß der parazelluläre Transport von quantitativ untergeordneter Rolle ist, so muß die zweifelsfrei nachgewiesene Rückkopplung der Wasserresorption auf die Elektrolytresorption durch bisher unbekannte zelluläre Mechanismen zustande kommen. Diese These bedeutet zwar einen Bruch mit den bisher formulierten Modellvorstellungen des Wassertransports im proximalen Tubulus, bietet aber, wie in der Diskussion ausgeführt wird, die Möglichkeit einer stringenten Erklärung für die glomerulotubuläre Balance (Proportionalität zwischen Volumenstromstärke

¹ Der Reflexionskoeffizient gibt an, in wie weit gelöste Partikel einer Flüssigkeit im gleichen Maße durch die Basalmembran gefiltert werden wie Wasser (83).

Ist die Basalmembran undurchlässig für die Substanz, so werden die in der filtrierten Flüssigkeit enthaltenen Partikel zurückgeworfen, der Reflexionskoeffizient beträgt dann 1, die Moleküle sind osmotisch voll wirksam. Können die gelösten Teilchen dem Wasser frei folgen, so ist der Reflexionskoeffizient gleich 0, die Substanz kann keinen osmotischen Gradienten aufrechterhalten.

und Volumenresorption) am proximalen Tubulus, die seit 1940 bekannt ist, aber noch immer nicht hinreichend erklärt ist (57, 59, 69, 70). Auch die Theorie der peritubulären Kontrolle, die die Rückwirkung interstitieller Nettodruckerhöhungen auf die resorptiven Prozesse des proximalen Tubulusepithels beschreibt, ließe sich als Subphänomen der Rückkopplung des transzellulären Wassertransports auf den Teilchentransport verstehen.

Arbeitshypothese und Versuchsansatz

Das eingangs beschriebene Modell des Wassertransports weist nicht nur Mängel auf bei der Erklärung von Phänomenen wie der glomerulo-tubulären Balance oder der peritubulären Kontrolle; weitere Gegenargumente ergeben sich aus der Überlegung, daß die Zuordnung eines größeren Anteils des Wassertransports auf den Bereich der tight-junction Komplexe unsinnig hohe hydraulische Leitfähigkeiten erfordern würde, da deren summarische Fläche weniger als ein Tausendstel der luminalen Membranfläche beträgt (121).

Unter der Voraussetzung, daß die Transportkapazität der parazellulären Wege durch das Epithel zu gering ist, um die Rückwirkung von Wasserflüssen auf den Elektrolyttransport zu erklären, ist es legitim, eine physiologische Modifikation der formalen Permeabilität der Zellen durch die transzellulären Wasserflüsse oder die sie verursachenden osmotischen Gradienten zu fordern.

Diese Hypothese kann dann experimentell geprüft werden, wenn es gelingt, den parazellulären Anteil des Elektrolyttransports getrennt vom transzellulären Anteil zu bestimmen. Darüberhinaus muß der Nachweis zu führen sein, daß der transzelluläre Transport durch



Änderungen des osmotischen transepithelialen Gradienten zu variieren ist.

Ein möglicher experimenteller Ansatz gründet sich auf die gut gesicherte Vorstellung, daß der parazelluläre Transport ausschließlich passiv² erfolgt. Entsprechend der Theorie der irreversiblen Thermodynamik läßt sich ein passiver Elektrolyttransport mathematisch als Summe von Partialflüssen beschreiben, die durch Diffusion, Konvektion und Elektrophorese verursacht werden. Während der Konvektionsterm mit dem Ausdruck $(1-\sigma_i) \cdot c_i \cdot J_v$ beschrieben wird (49), lassen sich der

diffusive und elektrophoretische Anteil über die Permeabilitätskonstante P_i , das transepitheliale Potential PD und den transepithelialen Konzentrationsgradienten c_i mit der Gleichung (I) (49) berechnen.

$$J_i = - P_i \cdot \left(\Delta c_i + z \frac{F}{R T} \cdot PD \cdot c_i \right) \quad \text{Gleichung (I)}$$

Als Parameter der parazellulären Elektrolytpermeabilität dient in dieser Arbeit der Ohmsche Widerstand des Epithels (54, 55). Der Widerstand läßt sich für die einzelnen Ionenarten näher spezifizieren mit Hilfe von Überföhrungszahlen (siehe Anhang 6.1.6.), die nachweislich von geringen Schwankungen des osmotischen Druckes auf beiden Seiten des Epithels unabhängig sind (37, 55). Eine Bestimmung des diffusiven und elektrophoretischen parazellulären Elektrolytflusses hat die Messung des transepithelialen Widerstands, des transepithelialen Potentials und der transepithelialen Elektrolytflüsse oder Konzentrationsgradienten zur Voraussetzung. Alle Meßgrößen müssen sowohl unter den Bedingungen einer transepithelialen Isotonie als auch bei Vorgabe eines

² Aktiv sei ein Transport dann, wenn ein Teilchenfluß über eine Membran nicht auf passive äußere Triebkräfte, das heißt elektrochemische, hydrostatische oder osmotische Gradienten, zurückgeführt werden kann (55).

transepithelialen osmotischen Gradienten ermittelt werden.

Folgender Versuchsansatz gewährleistet die simultane Messung aller erforderlichen Werte:

Infundiert man eine konzentrierte und damit hypertone artefizielle spätproximale Tubulusflüssigkeit in spätproximale Tubulussegmente, so sollte der transepitheliale Wasserfluß sistieren, sobald der luminale Teilchengehalt in etwa dem der basolateralen Spalten entspricht. Unter diesen experimentellen Bedingungen ist der Konvektionsterm annähernd Null, so daß der parazelluläre Anteil berechnet und in Beziehung zum Gesamtteilchenfluß gesetzt werden kann. Als Kontrolle dient die Perfusion mit einer hypotonen Kunstlösung.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere und gerätetechnische Voraussetzungen

Wir haben unsere Versuche an männlichen Munich Wistar Ratten durchgeführt, die mit einer Standarddiät gefüttert worden waren und ein Gewicht zwischen 150 und 250 Gramm hatten. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Inactin in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht betäubt und zur Mikropunktion präpariert.

Die Körpertemperatur wurde fortlaufend rektal gemessen und mit Hilfe eines heizbaren Operationstisches auf 37 Grad Celsius gehalten.

In die linke Vena femoralis wurde ein Katheter gelegt und fortlaufend eine Natriumchloridlösung infundiert mit einer Rate von 0,15 ml/min/kg Körpergewicht; die linke Arteria femoralis wurde kanüliert zur fortlaufenden blutigen Messung des arteriellen Blutdrucks mit einem strainingauge-Manometer und für Blutentnahmen zur Bestimmung der Plasmaosmolarität. Die Tiere wurden tracheotomiert und intubiert; die Blase wurde mittels einer medianen suprapubischen Inzision freigelegt und katheterisiert. Die linke Niere wurde mit einer Flankeninzision freigelegt und unter Erhalt der Nierenkapsel freipräpariert, in eine Nierenschale aus Plexiglas eingebettet und mit Ringer-Agar Agar in der Schale immobilisiert. Der Ureter der freipräparierten Niere wurde vorsichtig inzidiert und

zur Harnableitung ein Katheter bis kurz vor das Nierenbecken vorgeschoben. Die Nierenoberfläche wurde mit auf eine Temperatur von 37 Grad Celsius erwärmten Paraffinöl superfundiert, um einer durch einen Temperaturabfall möglichen Herabsetzung der Aktivität des Stoffwechsels der Nierenparenchymzellen und damit einer Verminderung der aktiven Transportrate vorzubeugen.

Zur Mikropunktion wurden Kapillaren mit einem Spitzendurchmesser von 2 μm bzw. 10 μm verwendet. Diese wurden mit einem Puller aus dünnem Kapillarglas gezogen, wobei die Form und der Durchmesser der Kapillarspitze abhängig sind von der vorgegebenen Federspannung und der Hitze des Drahtes. Die Spitze der Kapillaren wurde mit einem rotierenden Korundstein unter dem Mikroskop geschliffen.

Vor Versuchsbeginn wurden die Kapillaren mit einer frisch hergestellten und gefärbten Perfusionslösung luftblasenfrei gefüllt. Die Kapillarspitze wurde bis zur Punktion in Öl gehalten.

Bei den elektrophysiologischen Messungen diente ein Silberdraht, dem eine homogene Silberchloridschicht aufgeschmolzen war, als Stromabnehmer.

Das Meßgerät für die Potentiale stellte uns freundlicherweise Herr Professor Nagel, Physiologisches Institut der LMU München, zur Verfügung.

Neben zwei Meßeingängen verfügt das Gerät über zwei Referenzen, gegen deren Potentialdifferenz gemessen wird. Als Referenzelektroden dienten Silber/Silberchloriddrähte, die eingebettet waren in einem aus einer 1 molaren Kaliumchloridlösung hergestellten Agar-Agar-Gel.

Vor jedem Versuch wurden die Kapillarelektroden gegen diese Referenz in einer Ringerlösung gemessen. Als Beweis der Unversehrtheit der Meßköpfe galt die Anzeige eines Potentials von etwa 47mV, das dem theoretisch zu erwartenden liquid junction-Potential zwischen einer 1 molaren Kaliumchloridlösung und einer 150 millimolaren Natriumchloridlösung entspricht (exakter Wert: 47,32

mV, Berechnung siehe Anhang 6.1.5). Die beiden Kapillarelektroden, die in einem Versuch gemeinsam zum Einsatz kamen, wurden darüberhinaus auf Symmetrie hin verglichen: nur wenn die Potentialdifferenz innerhalb des Meßfehlers Null betrug, wurden die Elektroden verwendet.

Das inhärente Potential der gesamten Meßbrücke beträgt ebenfalls 47 mV, sobald ein leitender Kontakt zwischen dem Niereninterstitium und der Kapillarelektrode zustande kommt (Grenzflächen: Elektrodenflüssigkeit-Interstitium- 1 M KCl-Ag/AgCl. Schema der Meßbrücke siehe Anhang 6.1.5.). Dieses Potential wurde vor jeder Messung auf Null abgeglichen.

Der Aufbau des Arbeitsplatzes entsprach der in elektrophysiologischen Labors üblicherweise zur Anwendung kommenden Meßanordnung (Detailbeschreibung siehe "Laboratory Techniques in Membrane Biophysics", herausgegeben von H. Passow und R. Stämpfli, Springer Verlag 1969, Seite 106).

Alle Punktionen wurden unter Zuhilfenahme von Mikromanipulatoren (Firma Leitz) durchgeführt.

Die Perfusion wurde gesteuert mit einer Mikroperfusionspumpe, deren Antrieb über einen Tachygenerator elektronisch stabilisiert wurde.

Zur visuellen Kontrolle des Versuchsablaufs wurde die Nierenoberfläche mit einem Großfeldstereomikroskop betrachtet.

Bei den Messungen der transepithelialen Volumenfluxe wurden oberflächliche Nephrone mit Glaskapillaren punktiert, die einen Spitzendurchmesser von 10 bis 12 μm hatten. Als Perfusionsflüssigkeit wurde Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, die 6mM Natriumbicarbonat enthielt und deren Osmolarität gegenüber dem Plasma um bis zu 20 mosmol/l hypertön war. Einige Perfusionen wurden auch mit hypotoner Lösung durchgeführt (siehe Tabelle 1 im Anhang, 6.1.1.). Die Messung der Osmolarität erfolgte kryoskopisch mit Hilfe eines digitalen Osmometers (Firma Vogel, Gießen). Die Lösungen wurden mit FD/C-Farbstoff (85:15 -Mischung

aus Brilliant Blue #1 und Yellow #5) gefärbt und auf einen pH-Wert von 6,8 äquilibriert. Allen Lösungen wurde 14C-Hydroxymethylinulin in einer Konzentration von 1 mmol/l zugesetzt.

Zur Abdichtung der Tubuli wurde mit Sudanschwarz gefärbtes Rizinusöl verwendet.

2.2. Versuchsaufbauten

Messungen des Volumenfluxes

Mit einer Öl-gefüllten und mit einer Mikropumpe verbundenen Pipette wurde zunächst eine im mittleren Bereich eines proximalen Konvoluts gelegene Tubulusschlinge punktiert und durch Injektion kleiner Öltröpfchen die weiter distal gelegenen Segmente identifiziert. Die letzte dieser Schlingen wurde mit einer Sammelkapillare punktiert.

Eine Perfusionspipette mit der Krebs-Henseleit-Lösung wurde unmittelbar nach der proximalen Ölkapillare plaziert und danach sowohl proximal der Injektionsstelle als auch distal - am Ende des proximalen Konvoluts - ein Ölblock gesetzt. Das Ultrafiltrat wurde in der proximalen Ölkapillare gesammelt. Die luminal mit einer Perfusionsstromstärke von etwa 11 nl/min vorgegebene Lösung wurde mit der Sammelkapillare quantitativ über einen Zeitraum von 5 Minuten gesammelt.

Nach Beendigung der Sammelzeit wurden alle Pipetten entfernt, das Nephron für die Messung der Länge des perfundierten Segmentes mit Latex gefüllt und eine Skizze seiner oberflächlich gelegenen Schlingen mit den einzelnen Punktionsstellen angefertigt.

Bei allen Proben wurden das gesammelte Volumen und die Inulinkonzentration gemessen. Es wurden nur Messungen akzeptiert, deren Inulinrecovery besser als 90% und kleiner als 110% war.

Nach Abschluß des Versuchs wurden die Latex-gefüllten Nephronen aus der entnommenen und mazerierten Niere mikrodissiziert und vermessen.

Die Inulinmessung erfolgte mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung im Beckmann LS 8100 (jeder Probe (auf 200 nl aufgefüllt) wurden 8 ml Biofluor-Lösung zugesetzt).

Der transepitheliale Volumenflux berechnet sich dann aus folgender Formel:

$$C \text{ (Inulin/X)} \times V \text{ (x)} = C \text{ (Inulin/0)} \times V \text{ (0)} \quad (1)$$

$$\frac{C \text{ (Inulin/X)}}{C \text{ (Inulin/0)}} = \frac{TF}{P} = \frac{V(0)}{V(X)} \quad (1^*)$$

(Inulin)

$$\dot{V} \text{ (resorbiert)} = \dot{V} \text{ (0)} - \dot{V} \text{ (X)} \quad (2)$$

$$\dot{V} \text{ (resorbiert)} = \dot{V} \text{ (0)} - \dot{V} \text{ (0)} \cdot \frac{1}{TF/P_{(In)}} \quad (3)$$

$$\dot{V} \text{ (resorbiert)} = \dot{V} \text{ (0)} \left(1 - P/TF_{[In]} \right) \quad (3 \text{ in } 2)$$

(3*)

$$TF/P_{(In)} = \frac{\text{counts/sample} : \text{counts/Pumpenlösung}}{V \text{ (Sammellösung)} \quad 1 \text{ nl}} \quad (4)$$

$$\dot{V} \text{ (Sammellösung)} = \frac{\text{Skalenteile} \times 3,22}{\text{Vergrößerung} \times \text{Sammelzeit}} \quad (5)$$

Durch Substitution der Variablen in Gleichung (5 in 4 in 3*) erhält man den Wert für den transepithelialen Volumenflux.

Messung der Osmolarität der gesammelten Flüssigkeit

Bei den Perfusionsversuchen mit hypertoner Lösung wurde neben dem Volumen auch die Osmolarität der gesammelten Lösung untersucht.

Die Bestimmung der Osmolarität von Lösungen über die Gefrierpunktserniedrigung ist ein seit langem etabliertes Verfahren. Im Jahr 1965 wurde eine Methode beschrieben (Ramsay und Brown, 1967), die es erlaubt, den Teilchengehalt von Proben im Nanoliterbereich zu bestimmen. In den Versuchen dieser Arbeit kam ein Instrument zur Anwendung (Direct reading nanoliter osmometer, Clifton Technical Physics, Hartford, N.Y.), das in Abwandlung der Methode nach Ramsay und Brown die kryoskopische Osmolarität mißt. Das Gerät besteht im wesentlichen aus einem thermoelektrischen Kühlelement (Peltierelement) mit einem Aufsatz, in den die Proben in einzelne Löcher einpipettiert werden können. Die Löcher enthalten Immersionsöl und der gesamte Aufsatz hat zum thermoelektrischen Element lediglich über eine Schicht visköser wärmeleitender Paste Kontakt. Dies ermöglicht eine gleichmäßige Kühlung der Proben sowie eine hinreichend schnelle Äquilibrierung der Temperatur.

Der Meßvorgang selbst beginnt mit einer Kühlung der Proben bis auf -20 Grad Celsius, was zur Kristallisation der wässrigen Elektrolytlösungen führt. Die Meßgröße ist die Temperatur, bei welcher die Proben gerade wieder vollständig auftauen. Diese Temperatur ist zu ermitteln durch Beobachtung der Proben mittels eines Stereomikroskops bei manuell kontrollierter Hochregelung der Temperatur.

Das Auflösungsvermögen des Instruments hängt unter anderem vom Kühlwasserfluß, der Luftzufuhr und dem Meßbereich (Verstärkung) ab. Bei optimaler Einstellung des Geräts erreicht man eine Genauigkeit von 98% und eine Reproduzierbarkeit von 97%³. Unter diesen Voraussetzungen kann man eine Meßgenauigkeit von 1% im physiologischen Bereich erzielen, wenn man für jeder Messung eine Eichprobe mitbestimmt.

Das Auflösungsvermögen des Verfahrens ist andererseits auch abhängig von der Anzahl der biologisch identischen samples, die einer Messung zugeführt werden. So können - wenn alle technischen Größen optimiert worden sind - noch Unterschiede von 3 mosmol/l in physiologischen Lösungen gemessen werden, wenn ein Minimum von 29 Proben bestimmt wird. Sollen die Messungen einen Unterschied von 4 mosmol/l erfassen können, so sind immerhin noch 17 Proben notwendig, um eine statistische Signifikanz zu sichern. Dies ergibt sich aus folgender Gleichung (145), die den Zusammenhang herstellt zwischen dem gewünschten Delta und der Zahl der Proben:

$$\delta \geq \frac{\sqrt{\sigma^2}}{n} (t_{\alpha(2)v} + t_{\beta(1)v})$$

δ : der zu messende Unterschied

σ : Varianz der Mittelwerte

n : Anzahl

α, β : Irrtumswahrscheinlichkeiten

t : Teststatistik, deren kritische Werte $t_{\alpha(2)v}$ und $t_{\beta(1)v}$ darstellen

v : Anzahl der Freiheitsgrade

³ Die zehnmahlige Messung einer Eichlösung von 300 mosmol/l ergab 298 +/- 3 mosmol/l.

Potentialmessungen und Messungen des Widerstands

Für unsere elektrophysiologischen Messungen verwendeten wir folgendes Versuchsprotokoll:

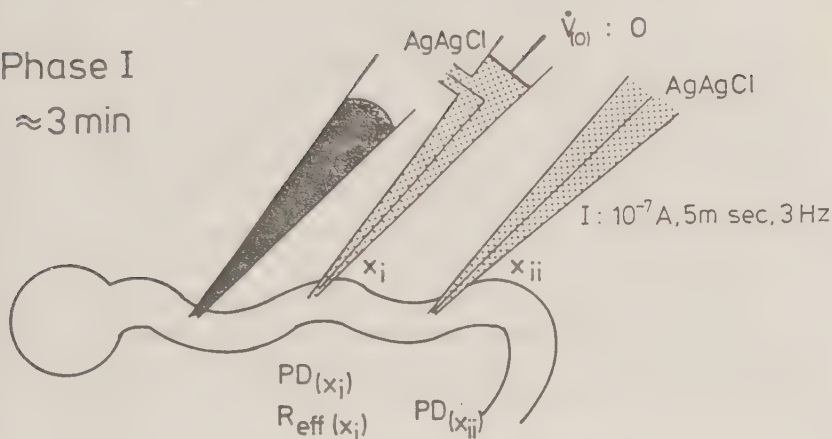
Zunächst wurde in Phase I mit einer Ölkapillare eine Tubulusschlinge punktiert und durch Injektion kleiner Öltröpfchen weitere stromabwärts gelegene Tubulusschlingen aufgesucht. Eine dieser Schlingen wurde anschließend mit einer zweiten Kapillare punktiert, die mit einer Perfusionspumpe verbunden war und eine Krebs-Henseleit-Lösung enthielt, die entweder 26mM oder 3mM Natriumbicarbonat enthielt und entweder 5mosmol/l hyperton oder 10 mosmol/l hypoton gegenüber der aktuellen Osmolarität des Plasmas war.

Der Spitzendurchmesser der zweiten Kapillare betrug 2 - 4 μm . Gleichzeitig konnte mit dieser Kapillare über eine Silber-/Silberchloridelektrode das transepitheliale Potential und der transepitheliale Widerstand registriert werden (Ling-Gerard-Elektrode). Zur Bestimmung des Ohmschen Widerstandes wurden Stromimpulse von 5 msec Dauer mit einer Stromstärke von 10^{-7} Ampere in den Tubulus eingespeist (Pulsfrequenz 3 Hz). Dazu wurde der Tubulus 50-100 μm distal der Elektrode mit einer dritten Glaskapillare punktiert. Der Spitzendurchmesser dieser Kapillare lag unter 2 μm und war mit derselben Lösung gefüllt wie die Perfusionskapillare (zur Vermeidung von liquid-junction-Potentialen).

Auch an die Strominjektionskapillare war ein Voltmeter angeschlossen, mit dem das transepitheliale Potential gemessen werden konnte. Beide Kapillarelektroden hatten einen Ohmschen Widerstand von zirka 5 MOhm. Nach der Punktion aller Tubulussegmente wurden zunächst etwa 3 Minuten lang das Frei-Fluß-Potential und der Widerstand unter Frei-Fluß-Bedingungen registriert (Phase I, siehe Abbildung 1). Anschließend wurde im Tubulus ein Ölblock gesetzt, die

Oil Pump - Currentinjection
Electrode

Phase I
 $\approx 3 \text{ min}$



Phase II
 $\approx 3 \text{ min}$

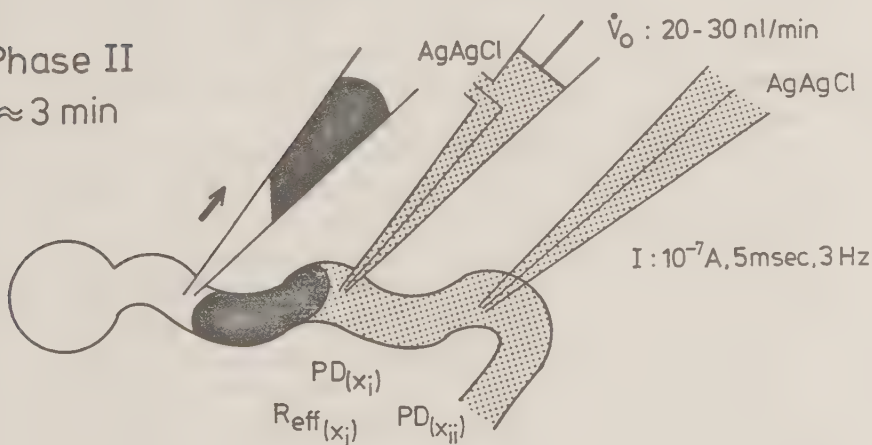


Abbildung 1

Versuchsanordnung bei der Messung des transepithelialen Potentials und Widerstands

Tubulusflüssigkeit abpunktiert und die distal des Blocks gelegenen Tubulussegmente mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Unter diesen Bedingungen wurden erneut Potential und Widerstand gemessen.

Die Differenz der Potentiale zweier interstitiell gelegener Elektroden diente als Referenz für die intraluminal gelegenen Kapillarelektroden: eine dieser Referenzelektroden war mit der Nierenoberfläche über eine 1 M KCl-Agar Agar-Brücke leitend verbunden, eine weitere Elektrode hatte über eine Ringerlösung Kontakt zum coupierten Schwanzende des Tiers.

Die während der luminalen Perfusion gemessenen Potentialwerte (Phase II, siehe Abbildung 1) wurden nur dann akzeptiert, wenn das zuvor gemessene free-flow-potential über 3 Minuten konstant größer als 1 mV (lumenpositiv) war.

Widerstandsmessungen wurden verworfen, wenn nicht mit beiden intraluminalen Elektroden annähernd gleiche und unter Frei-Fluß-Bedingungen lumenpositive Potentialdifferenzen von mehr als einem Millivolt gemessen wurden.

Um Störeinflüsse auf die Messungen zu minimieren, wurden alle Versuche im Faraday'schen Käfig durchgeführt.

Alle Potentialmessungen wurden um die jeweiligen Diffusionspotentiale an den Elektrodenspitzen korrigiert, die mittels der Nernst-Planck-Henderson-Gleichung unter Verwendung der gemessenen beziehungsweise vorgegebenen Ionenkonzentrationen berechnet worden waren. Diese liquid-junction-potentials wurden nach der von Barry und Diamond angegebenen Formel (12) ermittelt:

$$E_1 = \frac{R T}{F} \cdot \frac{\sum (u_i / z_i) (a_i' - a_i'')}{\sum u_i (a_i' - a_i'')} \cdot \ln \frac{\sum (a_i' \cdot u_i)}{\sum (a_i'' \cdot u_i)}$$

R: Gaskonstante

T: absolute Temperatur in Grad Kelvin

F: Faraday-Konstante

$u = \lambda^0$, limiting conductivity (cm²/ ohm·mol)

$a = \gamma_v C$

c: molare Konzentration

γ : Aktivitätskoeffizient

(es wird vorausgesetzt: $\gamma_{K+A-} = \gamma_{K+} \cdot \gamma_{A-}$)

Für die Koeffizienten wurden die von R.A. Robinson und R.H. Stokes angegebenen Werte eingesetzt (110).

Daraus berechnen sich folgende Korrekturpotentiale (Berechnungen siehe Anhang, 6.1.4.) unter der Voraussetzung, daß der Bicarbonatgehalt der interstitiellen Flüssigkeit 24mM beträgt und die intraluminalen Chloridkonzentration in den mittel- bis spätproximalen Tubulussegmenten auf 140 mM erhöht ist:

Perfusionslösung mit 6mM Bicarbonatgehalt:

Sobald ein leitender Kontakt zwischen der Nierenoberfläche und der Elektrode zustande kommt, tritt ein liquid-junction-potential von 0,9mV (Berechnung siehe Anhang 6.1.4.) auf, das vorab durch Justierung der Brücke korrigiert wird. Nach Punktion eines mittel- bis spätproximalen Tubulussegments, in dem die Bicarbonatkonzentration bereits deutlich erniedrigt ist auf Werte um 12 mM, muß durch Addition von 0,45mV (Berechnung siehe 6.1.4.) zu der gemessenen Potentialdifferenz wegen des nun niedrigeren liquid-junction-potentials das an der Oberfläche überkompensierte Potential nachkorrigiert werden. Während der intraluminalen Injektion der Kunstlösung tritt gar kein Diffusionspotential mehr auf und die gemessenen Werte müssen um +0,9 mV korrigiert werden.

Perfusionslösung mit 24mM Bicarbonatgehalt:

Erst bei intraluminaler Lage der Kapillaren unter free-flow-Bedingungen tritt ein Diffusionspotential

auf. Durch Subtraktion von 0,7 mV (Berechnung siehe Anhang 6.1.4.) von der gemessenen Potentialdifferenz erhält man die tatsächlich vorhandene transepitheliale Spannung.

Die Daten wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben auf ihre statistische Signifikanz untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Transepitheliale Volumenfluxmessungen

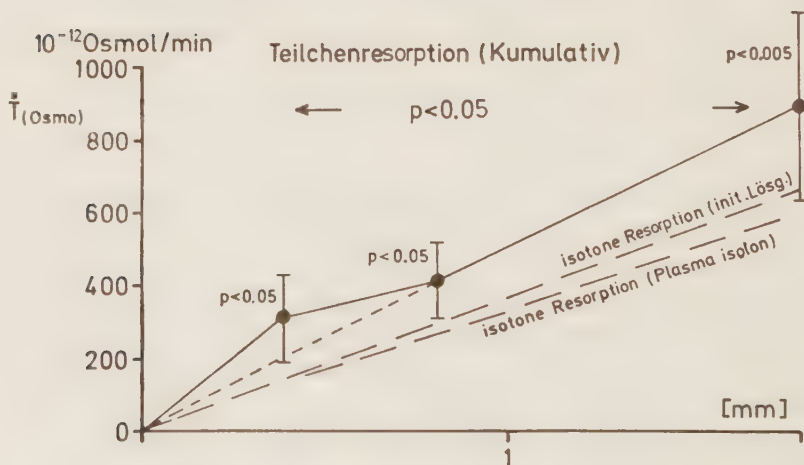
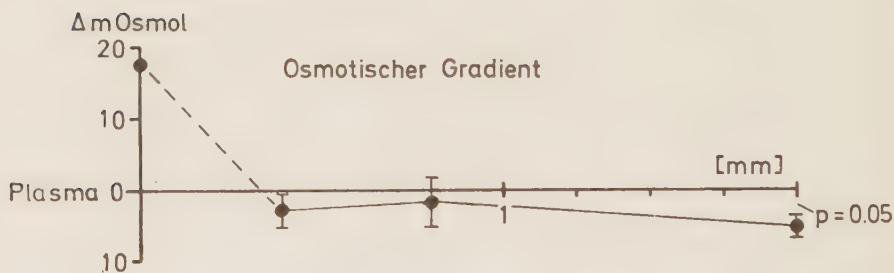
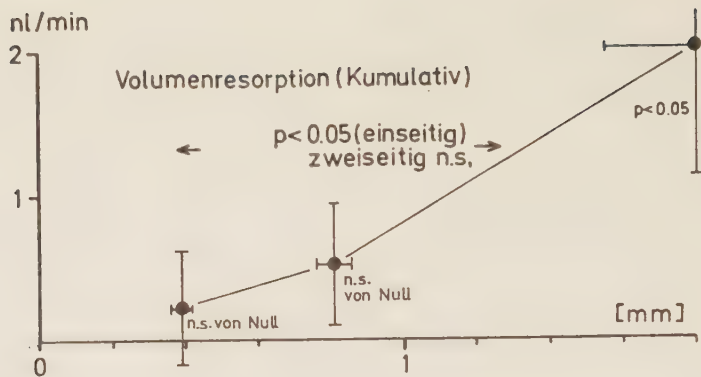
Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse von Mikroperfusionen mittel- bis spätproximaler Tubulussegmente mit hypertoner Krebs-Henseleit-Lösung unterschiedlichen Chloridgehalts.

Die Daten wurden in drei Gruppen zusammengefaßt nach Maßgabe der perfundierten Tubuluslänge.

Die erste Gruppe beschreibt den noch verbleibenden luminalen osmotischen Gradienten nach 0.39 mm Perfusionsstrecke und den transepithelialen Volumenflux über diesen Epithelabschnitt. Bis zum Ende dieses Anteils des Tubulus (Segment I) ist der vorgegebene lumeneinwärts gerichtete osmotische Gradient ausgeglichen, die Volumenresorption im gesamten Abschnitt nicht signifikant von Null unterschieden (siehe Tabelle 1, 6.1.1.).

Im zweiten Segment, das der perfundierten Strecke von 0.39mm Entfernung zur Punktionsstelle bis 0.81mm entspricht, kommt die Volumenresorption noch nicht in Gang: der Mittelwert der Daten liegt zwar geringfügig höher als der Mittelwert der ersten Gruppe, jedoch ist der Wert nicht signifikant von Null verschieden. Die luminale Osmolarität in diesem Segment entspricht der des Interstitiums, es existiert also kein signifikanter osmotischer Gradient (Berechnung siehe Tabelle 1, 6.1.1.).

Die dritte Gruppe von Daten entspricht den Meßwerten von 0.81 mm bis 1.8 mm Entfernung von der



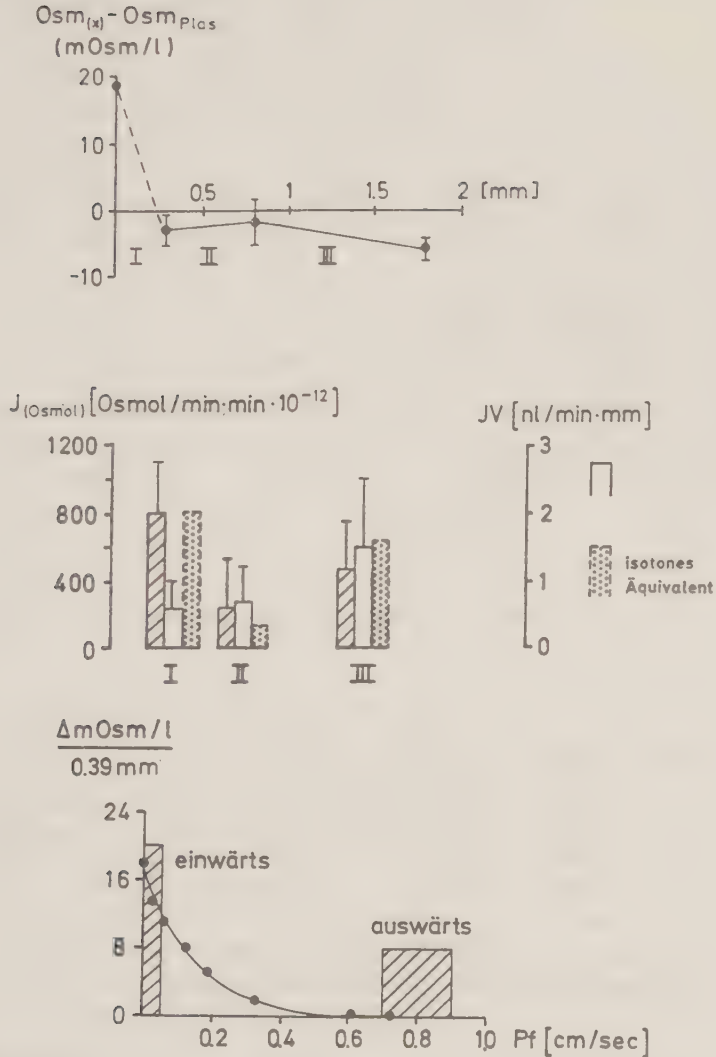


Abbildung 2

Perfusion mit hypertonen Lösungen: transepithelialer osmotischer Gradient, transepithelialer Volumenfluß und kumulative Teilchenresorption in drei Segmenten.

Das untere Diagramm zeigt den Verlauf der Äquilibration eines osmotischen Gradienten in Abhängigkeit von der hydraulischen Leitfähigkeit des Epithels

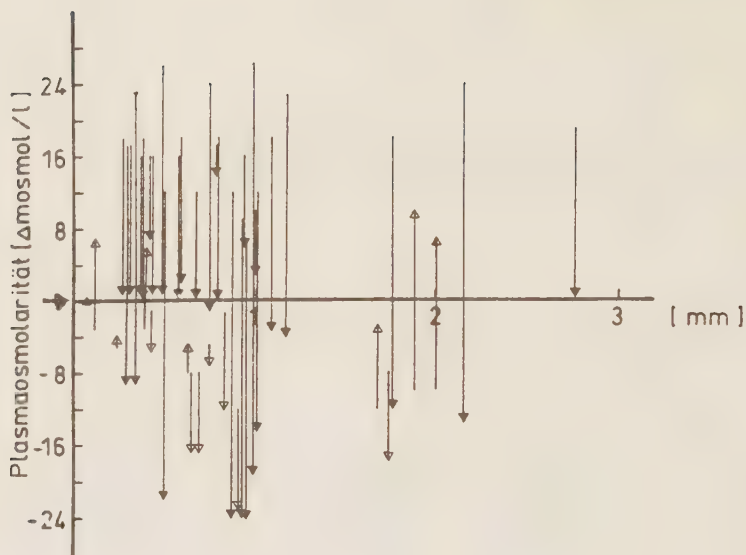


Abbildung 3

Dargestellt ist die Äquilibration eines vorgegebenen osmotischen Gradienten über die perfundierte Strecke
(Daten siehe 6.1.1.)

offene Dreiecke: hypotones Perfusionsmedium

geschlossene Dreiecke: hypertones Perfusionsmedium

Punktionsstelle. In diesem Abschnitt hat sich eine lumenale Hypotonizität aufgebaut, parallel dazu besteht ein lumenaußwärts gerichteter Volumenfluß.

Besonderes Augenmerk verdient die kumulative Teilchenresorption in den einzelnen Abschnitten. In allen drei Segmenten besteht ein signifikanter Teilchenausstrom, wobei die transportierte Teilchenmenge im dritten Segment signifikant größer ist als im ersten.

Die Tabelle mit den erhobenen Daten findet sich im Anhang 6.1.1.

Abbildung 3 zeigt separat die Abhängigkeit des transepithelialen Volumenflusses vom osmotischen Gradienten.

3.2. Messungen des transepithelialen Potentials

Das Diagramm (siehe Abbildung 4) zeigt die Veränderung des transepithelialen Potentials nach Vorgabe verschiedener Perfusionslösungen.

Wenn die native Tubulusflüssigkeit durch Krebs-Henseleit-Lösung mit normaler Bicarbonatkonzentration ersetzt wird, vermindert sich die ursprünglich lumenpositive Potentialdifferenz auf Werte um Null, unabhängig davon, ob die Krebs-Henseleit-Lösung isoton oder hypoton ist. Diese Beobachtungen sind identisch mit früheren in der Literatur mitgeteilten Befunden.

Anders jedoch sind die Ergebnisse mit Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung. Ersatz der spätproximalen Tubulusflüssigkeit durch leicht hypertone Krebs-Henseleit-Lösung mit gleichem oder gar höherem Chloridgradienten vermindert das lumenpositive Potential hochsignifikant auf Werte um $-0,28 \pm 0,32 \text{ mV}$

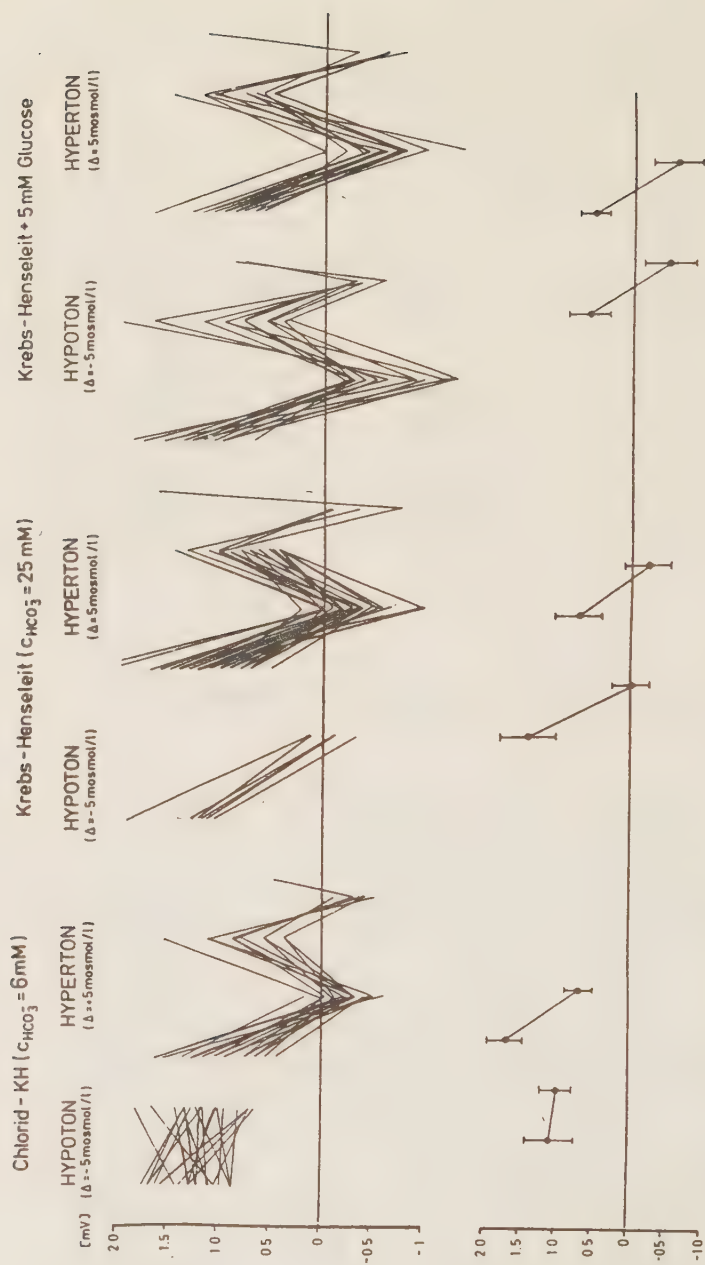


Abbildung 4 Das transepitheliale Potential in Abhängigkeit von der luminal vorgegebenen Lösung. Jede Linie entspricht dem Potentialsprung beim Wechsel von Freifluß- zu Perfusionsbedingungen bei der jeweils infundierten Lösung

anstatt es zu erhöhen. Interessanterweise unterbleibt dieser Abfall, wenn die Krebs-Henseleit-Lösung einige Milliosmol gegenüber dem systemischen arteriellen Plasma hypoton war.

Bei der dritten Versuchsreihe wurde der Perfusionslösung Glucose in einer Konzentration von 5mM zugesetzt. Glucose unterliegt im proximalen Tubulus einem aktiven rheogenen Cotransport mit Natriumionen. Ein Abfall des lumenpositiven Potentials auf deutlich negative intraluminale Potentialwerte ($-0.63 \pm 0.35\text{mV}$ beziehungsweise $-0.52 \pm 0.36\text{ mV}$, siehe Tabelle 2 im Anhang 6.1.2.) bei Perfusion mit Glucose-haltigen Lösungen ist in der Literatur vielfach dokumentiert und diente uns als Kontrolle der Validität unserer Messungen.

Ein signifikanter Abfall des Potentials ergibt sich bei allen Lösungen außer der hypotonen Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung.

Offensichtlich ist die Entstehung eines lumenpositiven Potentials gebunden an das Vorhandensein eines transepithelialen Chloridgradienten. Doch zeigen unsere Daten, daß dieses Potential letztlich erst dann auftritt, wenn zusätzlich ein transepithelialer osmotischer Gradient vorliegt.

Die Tabelle mit den Meßwerten findet sich im Anhang 6.1.2.

3.3. Messung des transepithelialen Widerstands

Im Diagramm (siehe Abbildung 5) sind die Eingangswiderstände unter Freiflußbedingungen aufgetragen gegen die entsprechenden Werte unter Perfusion mit Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung. Offene Symbole entsprechen Meßwerten mit isotoner Lösung,

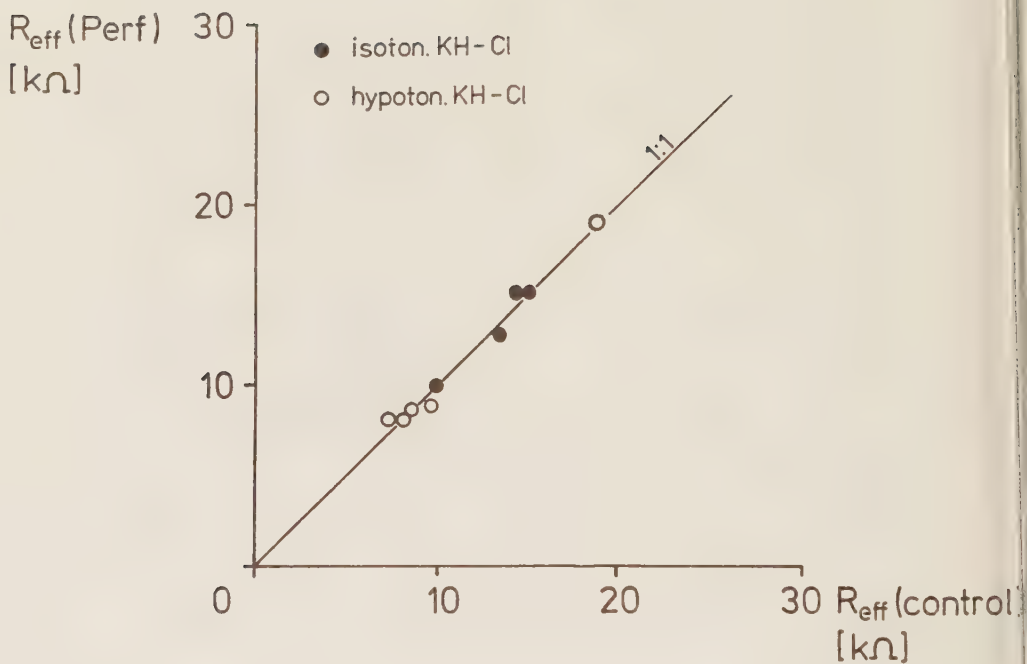


Abbildung 5

Der transepitheliale Widerstand in Abhängigkeit von der Tonizität der luminalen Lösung

geschlossene denen mit hypotoner Lösung. Die Werte sind eng um die 1:1-Gerade gruppiert. In der isotonen Gruppe betrug die mittlere Differenz im Paartest 0.9 kOhm bei einer Standardabweichung von 1.82 kOhm; der t-Wert war mit 1.11 nicht signifikant von Null verschieden. In der hypotonen Gruppe betrug die mittlere Differenz -0.08 kOhm bei einer Standardabweichung von 1.71 kOhm; der t-Wert war mit -0.2 ebenfalls nicht signifikant verschieden von Null. Da die Strecke zwischen den Elektroden bei der Messung gleich blieb und der Durchmesser der Tubulussegmente unter Freifluß- und Perfusionsbedingungen konstant blieb, darf daraus gefolgert werden, daß der transepitheliale Widerstand offenbar nicht oder nur gering verändert wird, wenn die spätproximale Tubulusflüssigkeit durch hyper- oder hypotone Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung ersetzt wird.

In der Tabelle des Anhangs 6.1.3. sind die Daten aufgeführt.

4. Diskussion

4.1. Befunde

4.1.1. Elektrophysiologische Messungen

4.1.1.1. Messungen der transepithelialen Potentialdifferenz

Asymmetrie der Meßbrücke

Wie bereits oben beschrieben (2.1.2.) war der zur Messung des transepithelialen Potentials verwendete Stromkreis als Konzentrationskette aufgebaut, bei der verschieden konzentrierte Lösungen aneinander grenzten. Die an diesen Grenzflächen auftretenden Diffusionspotentiale addierten sich durch die spiegelsymmetrische Anordnung der einzelnen Halbelemente vor Einfügung des Meßkompartiments in die Spannungskette auf Null. Sobald jedoch ein leitender Kontakt zwischen der vorgegebenen Lösung in der Meßelektrode und der Testflüssigkeit (interstitielle Flüssigkeit, spätproximale Tubulusflüssigkeit) zustande kommt, tritt eine Spannung auf, die dem Diffusionspotential der Grenzfläche beider Lösungen entspricht. Wegen des unterschiedlichen Gehalts an diffusiblen, geladenen Teilchen ist dieses Potential für die interstitielle Flüssigkeit und die spätproximale Tubulusflüssigkeit verschieden.

Das intraluminal abzuleitende Potential setzt sich also aus mehreren Komponenten zusammen: neben dem Potential, das ursächlich mit der transepithelialen Wasser- und Salzbewegung in Zusammenhang steht, geht auch das Potential, das an der Kapillarspitze entsteht, mit in die Messung ein.

Der Anteil des Diffusionspotentials läßt sich während der Ableitung nicht messen, exakte Werte für diese "liquid-junctions" sind jedoch zur Interpretation der Befunde unerlässlich. Geeignete Methoden zur Bestimmung von Diffusionspotentialen sind einmal die direkte Messung in Simulationsversuchen, zum anderen die Berechnung der elektromotorischen Kraft an aneinandergrenzenden Elektrolytlösungen durch die Nernst'sche Gleichung.

In dieser Arbeit wurden die Potentiale mittels der von Barry und Diamond modifizierten Nernst-Planck-Hendersonschen Gleichung errechnet. Die Absolutwerte (siehe Anhang 6.1.4.) der so ermittelten Potentiale liegen um 0,2 bis 0,3mV niedriger als die von Frömter und Gessner (50) oder Howlin et al (78) gemessenen Werte mit Hilfe der Technik der fließenden Brücken und Potentialableitung über Silber-Silberchloridelektroden in gesättigter KCl-Lösung.

Zwei Gründe kommen für diese kleine Diskrepanz zwischen errechneten und gemessenen Werten in Betracht. Einerseits könnten die nicht zu vermeidenden Ungenauigkeiten bei der Interpolation der zahlreichen Konstanten, die in die Nernst-Planck-Henderson-Gleichung eingehen (Aktivitätskoeffizienten, Ionenbeweglichkeitsgrenzwert, Temperaturkoeffizient), in ihrer Summe diese Differenz erklären. Andererseits zeigen die Untersuchungen von Laprade und Cardinal (27) eindeutig, daß die Diffusionspotentiale niedrig konzentrierter Elektrolytlösungen - wie sie physiologischerseits vorkommen - an der Grenzfläche zu gesättigter Kaliumchloridlösung nicht vernachlässigt werden dürfen, wie dies bei den Messungen von Frömter

und Howlin der Fall war. In der Tat werden dadurch die Diffusionspotentiale um etwa 30% zu hoch bestimmt.

Das transepitheliale Potential

In der Literatur wird eine Vielzahl von Befunden aus elektrophysiologischen Messungen mitgeteilt, mit denen es die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu vergleichen gilt.

Lumenpositives Freiflußpotential

Wie die intraluminalen Ableitungen zeigten (3.2., Abbildung 4), ist in den spätproximalen Tubulussegmenten die transepitheliale elektrische Potentialdifferenz lumenpositiv. Diese Beobachtung stimmt sehr gut mit zahlreichen früheren Messungen überein (7, 10, 11, 51, 52, 53, 72, 78, 101, 120).

Abhängigkeit des lumenpositiven Potentials vom Chloridgradienten

Wie Abbildung 4 zeigt, ist das Auftreten dieses Potentials an das Vorliegen einer hohen Chlorid- bzw. niedrigen Bicarbonat- Konzentration im Serum gebunden. Dieser Befund wurde ebenfalls mehrfach in der Literatur mitgeteilt (3, 7, 19, 28, 82, 117, 118, 131).

Wirkung von Glucose auf die Potentialdifferenz

Ferner bestätigen die in Abbildung 4, Teil (3), gezeigten Daten frühere Beobachtungen, wonach in Anwesenheit von Glucose und regulärer Krebs-Henseleit-Lösung (Bicarbonatgehalt 24mM) das transepitheliale Potential in Folge eines aktiven Transportpotentials an der apikalen Zellmembran lumennegativ wird.

Abhängigkeit der Lumenpositivität von der luminalen Hypotonizität

Der Schlüsselbefund dieser Meßreihe ist jedoch, daß das lumenpositive Potential nur dann mit künstlichen spätproximalen Lösungen reproduziert werden kann, wenn die vorgegebenen Lösungen hypoton gegenüber dem Blut sind. Dieser Befund entspricht unter Berücksichtigung bestimmter Einflußfaktoren ebenfalls früheren Beobachtungen aus zwei Versuchsreihen, bei denen die luminalen Elektrolytkonzentration ebenfalls unter die Plasmakonzentration abgesenkt wurde (21, 98, siehe auch Abbildung 6).

Neu ist jedoch die Beobachtung, daß mit regulären Krebs-Henseleit-Lösungen unabhängig von der relativen Tonizität der Lösung kein transepitheliales Potential zu generieren ist.

Das transepitheliale Potential, das direkt am Infusionsort durch die Mikroelektrode abgeleitet wird, gibt unverfälscht den Spannungsabfall wider, den eine Lösung mit der Zusammensetzung der infundierten Flüssigkeit über das Epithel verursacht. Geht man davon aus, daß dieses lumenpositive Potential ein Diffusionspotential ist (siehe unten und Anhang 6.1.6.), dann ist die durch die Injektion hypotoner Lösungen bedingte Zunahme der Lumenpositivität in erster Linie auf die Verdünnung der intraluminalen Konzentration an Natriumchlorid zurückzuführen.

So beobachtet man mit Perfusionslösungen⁴, denen bei einer NaCl-Konzentration von etwa 110 mM Raffinose zum Angleich an die Plasmaosmolarität beigelegt wird, ebenfalls lumenpositive Potentiale. Die Größe des Potentials verändert sich gleichsinnig mit dem Konzentrationsgradienten für Natriumchlorid, der durch den Zusatz nicht resorbierbarer Zucker zur luminalen

⁴ Diese isoosmotischen Lösungen, die zum Erliegen des Wasserflusses führen, heißen auch Gleichgewichtslösungen.

Luminal hypotonicity and proximal tubular transport

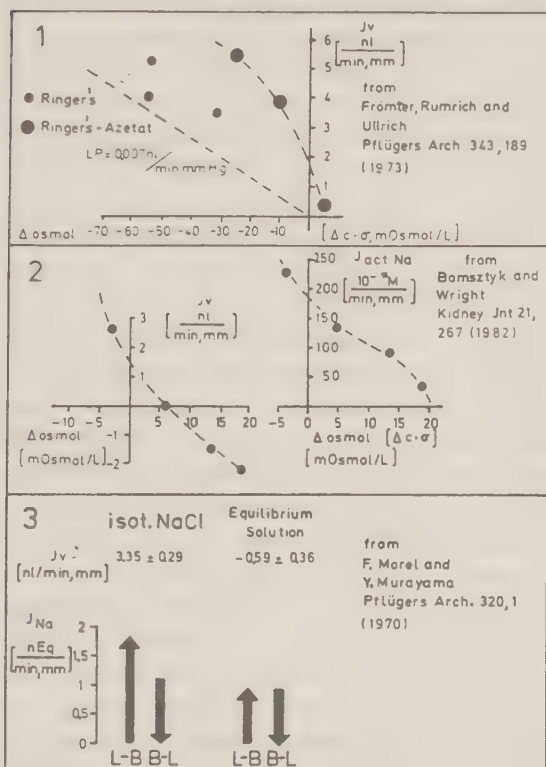


Abbildung 6 Der Transport im proximalen Tubulus in Abhängigkeit von der Tonizität der luminalen Lösung (Literaturzitate 55, 21, 98)

Flüssigkeit und dadurch bedingten Wassereinstrom variiert werden kann (20, 22, 55).

Mechanismus der Potentialentstehung

Viele Argumente stützen die These, daß das transepitheliale Potential weitgehend durch Diffusion von geladenen Teilchen entsteht und damit rein passiver Genese ist.

Dafür sprechen zum einen Befunde, nach denen das Potential an proximalen Tubulussegmenten auch dann auftritt, wenn der Stoffwechsel der Zellen blockiert ist, z.B. durch Vergiftung der Zellen mit Zyanid (2, 28, 65, 78) oder durch Kühlen der Tubuli (13, 19). Voraussetzung ist allerdings, daß binnenseitig eine Lösung appliziert wird, deren Chloridkonzentration höher, deren Bicarbonatkonzentration jedoch niedriger liegt als die des Serums.

Durch simultane Perfusion von Lumen und peritubulären Kapillaren mit physiologischer Kochsalzlösung konnten Frömter, Müller und Wick (54) demonstrieren, daß das Tubulusepithel praktisch symmetrische Spannungen generiert, wenn jeweils auf einer Seite ein Teil der Lösung durch Raffinose ersetzt worden war. Eine ähnliche Symmetrie ergab sich, wenn jeweils ein Teil der Chloridionen auf einer Seite durch ein weniger permeables Ion ersetzt wurde.

Nach den genannten Untersuchungen kann das lumenpositive Potential sowohl nach Richtung wie auch weitgehend nach Größe als passives, das heißt vom Zellstoffwechsel unabhängiges Phänomen, beschrieben werden. Handelte es sich dabei um ein Strömungspotential, so müßte das Lumen bei Volumenresorptionsvorgängen relativ negativ geladen sein, bei Nettovolumensekretion dagegen positiv. Außerdem läge ein solches Potential bei den osmotischen

Gradienten, die physiologischerweise vorkommen, innerhalb des Meßfehlers.

Wenn aber das lumenpositive Potential als Diffusionspotential über die tight-junction-Komplexe aufgefaßt wird, folgt daraus zwingend, daß Veränderungen dieses Potentials weitgehend Änderungen des transjunktionalen Ionengradienten widerspiegeln, vorausgesetzt, es treten keine weiteren Potentiale auf.

Das transepitheliale Potential mit Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Lösung

Zu klären bleibt die Frage, warum zwar mit hypotonen Chlorid-Ringer-Lösungen, nicht aber mit Bicarbonat-Ringer-Lösungen ein lumenpositives Potential auftritt, und warum dieses Potential erst nach Zugabe größerer Mengen von Mannitol beobachtet werden kann (22).

Die wahrscheinlichste Erklärung ist, daß, wie Burckhardt, Sato und Frömter bereits zeigten (24), das Tubulusepithel eine signifikante passive elektrogene Bicarbonat-Permeabilität besitzt (siehe auch 8, 87, Anhang 6.1.6.). Nur so kann der vom Blut ins Lumen gerichtete Bicarbonatgradient additiv zum NaCl-Gradienten, der vom Lumen ins Blut wirksam wird, ein Diffusionspotential erzeugen. Dieses Potential ist in der Summe der Teilkomponenten positiv, wenngleich die Lumenpositivität durch den Bicarbonatgradienten abgeschwächt wird (siehe Anhang 6.1.6.). Wird nun der Chlorid-Bicarbonat-Gradient durch luminale Vorgabe von Bicarbonat-Ringer-Lösung beseitigt, nimmt diese Lumenpositivität weiter ab. Verdünnt man zusätzlich die Ausgangslösung auf hypotone Werte, dann wird der Chloridgradient noch weiter nivelliert und damit elektrochemisch unwirksam, durch die Abnahme der Konzentration von Natriumionen parallel dazu entsteht jedoch ein lumenpositives Diffusionspotential. Wegen der gleichzeitig wirksam werdenden Verdünnung der

Bicarbonatkonzentration wird diese Potentialkomponente aber teilweise kompensiert. Erst bei sehr starker Verdünnung tritt dann ein deutlich lumenpositives Potential zutage.

In diesem Zusammenhang dürfen Befunde, die am isolierten perfundierten Kaninchentubulus erhoben wurden, nicht außer Acht bleiben. Nach Untersuchungen von Berry (13) tritt bei luminaler Vorgabe von regulärer Bicarbonat-Krebs-Henseleit-Lösung ohne Zusatz organischer Substanzen (Glucose, Aminosäuren) ein lumennegativ gerichtetes Potential auf, dessen Betrag zunimmt, wenn die Carboanhydratase dieser Tubuli mit Azetazolamid blockiert wird. Die Arbeitsgruppe um Andreoli (118) hatte in früheren Studien ebenfalls ein lumennegatives Potential beschrieben, das als Ausdruck eines rheogenen Natriumtransports aufgefaßt wurde, da es durch die Gabe von Ouabain (117) oder Hemmung des Zellstoffwechsels (117) beseitigt werden konnte. Berry folgerte daraus, daß das lumennegative Potential in Gegenwart von physiologischen Elektrolytlösungen hohen Bicarbonatgehalts als steady-state zwischen dem Diffusionspotential einerseits und einem Natriumtransportpotential andererseits aufgefaßt werden muß.

Falls diese Mechanismen für den Rattentubulus überhaupt relevant sein sollten, wäre nicht auszuschließen, daß Wechselwirkungen des transepithelialen osmotischen Gradienten mit diesen Transportprozessen zu Verschiebungen in dem genannten steady state führen könnten, sowohl durch eine Einflußnahme auf das Diffusionspotential als auch durch eine Modifikation des aktiven Transportgeschehens .

Schlußfolgerungen aus den Potentialmessungen

Das Milieu der basolateralen Spalten

Wie Abbildung 4 zeigt, tritt unter Freiflußbedingungen ein lumenpositives Potential von $1,5 \pm 0,35$ mV auf. Ersetzt man die native Tubulusflüssigkeit durch eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung, deren Zusammensetzung der spätproximalen Tubulusflüssigkeit entspricht mit einer Bicarbonatkonzentration von etwa 5mM und einer kryoskopischen Osmolarität, die gegenüber dem Plasmameßwert desselben Versuchstieres um etwa 10 mosmol/l erniedrigt eingestellt worden war, so ergibt sich keine signifikante Änderung des transtubulären Potentials: offensichtlich sind die in der Ersatzlösung vorgegebenen Substanzen an der Genese des Freiflußpotentials ursächlich beteiligt. Unter der Annahme, dieses Potential entstehe durch die Diffusion geladener Teilchen, ist es statthaft, auf die das Potential bestimmenden Konzentrationen von Natriumionen, Chlorid und Bicarbonat auf der basolateralen Seite des Epithels rückzuschließen. Interessanterweise entsprechen die so errechneten Werte den Plasmakonzentrationen dieser Elektrolyte unter Berücksichtigung des Donnaneffektes einer Proteinladung von 16 mval/l und einem Donnanfaktor von 1,055 für Natriumionen und von 1,045 für Chlorid und Bicarbonat. Ein Zusammenbruch des intraluminalen Potentials, wie dies nach Injektion plasmaisotoner oder hypertoner Lösungen in dieser Arbeit dokumentiert wurde, wäre in einem solchen Modell des Epithels nur als Folge einer symmetrischen Verteilung der Ionen über das Epithel zu erwarten. Offensichtlich ist das Epithel unter den genannten experimentellen Bedingungen nicht in der Lage, ein gegenüber dem Lumen hypertones Kompartiment in den basolateralen Spalten aufrechtzuerhalten (siehe 4.1.2).

Andererseits ist die Transportrate des Natrium-Glucose-Cocarriers, die ihren Ausdruck in der initialen Lumen negativität des proximalen Tubulus findet, durch die Osmolarität der luminalen Flüssigkeit nicht zu beeinflussen, sondern getrieben vom elektrochemischen Gradienten für Natriumionen. Die Reproduktion dieses Befundes diente uns als Hinweis auf die Unversehrtheit des Epithels in der unmittelbaren Nähe der Punktionsstelle, andererseits als Beleg dafür, daß eine Erhöhung der luminalen Osmolarität keine meßbare Rückwirkung auf den elektrochemischen Gradienten von Natrium haben kann, der die Aufnahme von Glucose in die Zelle treibt.

Die oben postulierte Äquilibrierung der Flüssigkeiten auf beiden Seiten der tight-junction-Komplexe während der Perfusion hypertoner Lösungen kann durch die Verschiebung von Wasser (aus dem basolateralen Labyrinth in die Perfusionsflüssigkeit) und /oder durch Teilchenausstrom von luminal nach basal vonstatten gehen. Die letztere Alternative ist aufgrund der gemessenen Potentialabnahme und den Berechnungen im Anhang in jedem Fall zutreffend. Wie dort im einzelnen dargestellt (siehe 6.1.1.), ist wegen der im Plasma anders als in der spätproximalen Flüssigkeit vorhandenen organischen Bestandteile die Konzentration der Elektrolyte bei Isotonie auf der Blutseite niedriger als in der Tubulusflüssigkeit. Die Elektrolytkonzentration der basolateralen Spalten kann bei luminaler Applikation hypertoner Flüssigkeiten niemals allein durch Wasserentzug aus den basolateralen Spalten die hohen Werte erreichen, die sich dort einstellen. Dies ist rein rechnerisch nur dann möglich, wenn gegenläufig zum Wassereinstrom ein Auswärtstransport von Teilchen stattfindet, der zu einer Änderung des Konzentrationsprofils der Flüssigkeit der basolateralen Spalten führt, die ja nativ etwa der interstitiellen Flüssigkeit entspricht.

4.1.1.2f Messung des Eingangswiderstands

Die Messung des transepithelialen Ohmschen Epithelwiderstands erbrachte zwei Ergebnisse:

1. Der Eingangswiderstand, der dem Quotienten aus der mit der Meßelektrode registrierten transepithelialen Spannung und dem injezierten Gleichstrom entspricht, ändert sich nicht, wenn die natürliche intratubuläre Flüssigkeit durch eine künstliche Lösung gleicher oder höherer Osmolarität ersetzt wird. Dies ist aus Abbildung 5 ersichtlich.

Da außer dem Teilchengehalt alle weiteren Einflußgrößen konstant blieben, insbesondere auch der Abstand zwischen den Elektroden, die intratubuläre Stromstärke und damit der Tubulusdurchmesser sowie annähernd der spezifische Widerstand der intraluminalen Flüssigkeit, ist zu folgern, daß auch der spezifische Ohmsche Wandwiderstand unverändert geblieben ist.

2. Die hier gemessenen transepithelialen Wandwiderstände von $3.87 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ entsprechen in etwa den von anderen Autoren mitgeteilten Werten. Die registrierte Potentialdifferenz nach Eingabe von 10^{-7} A Stromstärke ins Lumen repräsentiert im wesentlichen den Widerstand der parazellulären Transportwege, weil die Membranwiderstände der proximalen Tubuluszellen um zwei Zehnerpotenzen größer liegen und als parallel zu den parazellulären Spalten liegende Widerstände nur minimale Stromstärken ableiten (6, 47).

Aus dem Gesamtwiderstand und den Überführungszahlen lassen sich partielle Leitfähigkeiten und Elektrolytpermeabilitätskonstanten errechnen (siehe Anhang 6.1.8., 6.1.9.). Die auf diese Weise für Natrium- und Chloridionen errechneten Werte entsprechen

in etwa den in der Literatur mitgeteilten Werten (6, 48).

4.1.2. Flußmessungen

Hypertones Resorbat

Wie die Befunde zeigen, ist die Tubulusflüssigkeit hypoton. Diese Beobachtung stimmt mit zahlreichen früheren Untersuchungen überein (4, 9, 63, 71, 90, 114, 129). Die Ursache dieser Hypotonizität ist die Resorption von Teilchen durch den Tubulus (siehe Abbildung 2). Dies folgt aus der Beobachtung transepithelialer osmotischer Gradienten, die artefiziell in Mikropunktionsversuchen vorgegeben werden: bei der Infusion hypertoner Lösungen ergibt sich bereits innerhalb einer Strecke von weniger als 0.4 mm des perfundierten Segmentes eine Nivellierung des Gradienten, im weiteren Verlauf schließlich eine Restitution der luminalen Hypotonizität, wie sie nativ gefunden wird. Wird dagegen ein anders gerichteter osmotischer Gradient hergestellt, so bleibt dieser in unveränderter Höhe über die nachfolgenden Segmente hin bestehen (siehe Abbildung 2). Wie im Abschnitt "Ergebnisse" dargestellt, ist die Flüssigkeitsresorption streng an die Ausbildung eines solchen Teilchenungleichgewichts gebunden, wie es auch nach der Theorie der osmotischen Kopplung des Wassertransportes zu erwarten ist.

Anisotropie des Wasserflusses

Von einem "isotonen" Transport, wie er ursprünglich für das proximale Tubulusepithel formuliert worden ist, kann de facto nicht mehr die Rede sein.

Die Frage, welcher Mechanismus der "hypotonen" Resorption zugrunde liegen könnte, ist derzeit nicht mit letzter Sicherheit zu beantworten. Die im Folgenden aufgeführten Befunde können jedoch bereits erste hypothetische Modellvorstellungen begründen:

Nachdem sich im initialen Segment (I) hypertone Lösungen bereits mit dem peritubulären Milieu bezüglich des Teilchengehalts äquilibriert haben, bleibt im daran anschließenden Segment (II) nicht nur die Flüssigkeitsresorption, sondern auch die Teilchenresorption gering. Aus diesem Befund lassen sich die Transportvorgänge im Segment (I) näher charakterisieren: Die Äquilibrierung des transepithelialen Gradienten erfolgte ohne Nettovolumenresorption. Dementsprechend kann die Angleichung des Teilchengehalts nur durch initialen Wassereinstrom - bei einer hydraulischen Leitfähigkeit von $P_f > 0,3 \text{ cm/sec}$ - und daran anschließende Rückresorption oder durch einen massiven Nettoteilchenausstrom zu erklären sein. Nun kann die Äquilibrierung eines osmotischen Gradienten durch Wassereinstrom aufgrund der elementaren physikalischen Gesetzmäßigkeiten nur zur Isotonie führen. Da das isotone luminale Kompartiment im Nephronabschnitt II der Versuchsreihe nicht resorbiert, kann die Äquilibrierung im Nephronabschnitt I nicht durch Wassereinstrom und anschließende Rückresorption bis zum Abschnitt II erfolgt sein, sondern nur durch Teilchenausstrom. Folglich kann nur ein Teilchenausstrom für den Wiederaufbau der luminalen Hypotonizität im Abschnitt III verantwortlich sein.

Die hydraulische Leitfähigkeit des Tubulusepithels, die von luminal nach peritubulär wirksam wird, läßt sich im Gegensatz zur hydraulischen Leitfähigkeit von der Blut- zur Lumenseite experimentell bestimmen. Die Beobachtung, daß der artefiziell vorgegebene hypertone Gradient keinen Wassereinstrom ins Tubuluslumen induziert, spricht jedoch dafür, daß die lumeneinwärts

gerichtete Wasserleitfähigkeit kleiner als 0,1 cm/sec ist, und/oder, daß die effektive Osmolarität der infundierten Lösung erheblich kleiner ist als die kryoskopisch gemessene Osmolarität⁵.

Luminale versus peritubuläre osmotische Kopplung

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit führen unzweideutig zu dem Schluß, daß in mit hypertonen Lösungen perfundierten Segmenten kein genügend hoher osmotischer Gradient in den basolateralen Spalten aufgebaut werden kann, der als Triebkraft für eine nennenswerte Wasserresorption dienen könnte. Auch diese Schlußfolgerung wird gestützt durch in der Literatur mitgeteilte Beobachtungen. So fanden Erik, Persson und Mitarbeiter (43) eine konzentrationsabhängige Hemmung der Flüssigkeitsresorption in Tubuli, deren Lumina mit kolloidhaltigen und damit gegenüber dem Plasma hypertonen Lösungen perfundiert wurden. Ähnliche Zusammenhänge können auch aus den Arbeiten von Bomszyk und Wright (21) (siehe auch Abbildung 6) und Williams et al (139) abgeleitet werden.

Erst nachdem die Osmolarität der luminalen Flüssigkeit unter die des Plasmas abgesunken ist - was bei fehlenden passiven Triebkräften nur durch aktive Resorptionsprozesse erfolgt sein kann -, kommt der Wassertransport wieder in Gang, parallel dazu nimmt auch die Teilchenresorption zu (Segment III).

Einerseits verursacht also die Resorption von osmotisch wirksamen Teilchen die Wasserresorption, andererseits besteht auch eine Rückkopplung des Wassertransports auf die Elektrolytresorption im Sinne einer Stimulation. Die in Abbildung 2 dargestellten

⁵ Solche Äquilibrierungsprozesse ursprünglich hypertoner Lösungen durch Wassereinstrom sind mit künstlichen Tubulusflüssigkeiten, denen nicht resorbierbare Zucker zugesetzt worden waren, durchaus beobachtet worden (20, 57, 66, 97, 127, 130).

Messungen des transepithelialen Volumenfluxes bei Perfusion mit Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung liefern einen experimentellen Beleg für diese Annahme. Rein phänomenologisch stimmt diese Beobachtung mit früheren Analysen auf der Grundlage der irreversiblen Thermodynamik überein (55), die für Natriumionen und Chlorid Reflexionskoeffizienten mit Werten von deutlich kleiner als 1 voraussetzten.

Mechanismus des Teilchenausstroms

Wie im Anhang ausführlich dargestellt muß der im initialen Segment (siehe Abbildung 2) zur osmotischen Äquilibration führende Teilchenausstrom aus der luminal vorgegebenen Chlorid-Krebs-Henseleit-Lösung zum größeren Teil transzellulär und nicht parazellulär erfolgen. Quantitativ aufschlüsseln lassen sich die beiden Komponenten durch Umrechnung des Gesamtwiderstands des Epithels, der in erster Linie die parazelluläre Elektrolytpermeabilität widerspiegelt (siehe 4.1.1.2.), in eine Natriumionen- und Chloridpermeabilität (siehe 6.2.9.); aus den so ermittelten Permeabilitätskonstanten und dem elektrochemischen Gradienten errechnet sich der Nettoausstrom von Natriumchlorid während der osmotischen Äquilibration (siehe Anhang 6.1.7.). Der so geschätzte Natriumchloridausstrom beträgt nur etwa 30% der gesamten Teilchenresorption. Dieser Wert stimmt gut mit neueren Literaturdaten überein (17). Da die verbleibenden zwei Drittel der Elektrolytresorption elektrisch stumm, nämlich ohne Auswirkung auf den Ohmschen Epithelwiderstand erfolgen, muß dieser Transport elektroneutral erfolgen, zum Beispiel als Natrium-Chlorid-Cotransport.

Dies steht im Widerspruch zu früheren Befunden von Burckhardt, Cassola und Frömter (23), nach denen die Chloridleitfähigkeit der peritubulären Zellmembran zu vernachlässigen ist. Besonders hoch sei nach

Burckhardt, Sato und Frömter (24) dagegen die partielle Leitfähigkeit für Bicarbonat. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kamen Yoshitomi und Frömter (144), da sie fanden, daß der passive rheogene Bicarbonattransport von Epithelzellen mit SITS zu blockieren sei.

Jedoch sind transzelluläre Transportwege für Chlorid von anderen Autoren wiederholt postuliert worden (132). Geht man davon aus, daß der aktive term des transzellulären Natriumtransports eher abnimmt als zunimmt (siehe Abbildung 2, außerdem 20, 115) und zieht man daneben in Betracht, daß die osmotisch äquilibrierte Lösung im Segment II trotz eines fortbestehenden Chloridgradienten nur sehr langsam resorbiert wird, dann wäre dieser Transportweg eher als passiv zu charakterisieren. In Übereinstimmung mit dieser Annahme sind an den Zellen des proximalen Tubulusepithels volumenregulatorische Prozesse beschrieben worden, die unabhängig von der durch Ouabain blockierbaren Natrium-Kalium-ATPase ablaufen (60, 105, 106), und die zumindest an der Hundeniere nicht mit dem Furosemid/Etacrynsäure-sensiblen Natrium-Kalium-2-Chlorid-Transport identisch zu sein scheinen (126). Die zellphysiologischen Vorgänge, die nach einem osmotischen challenge in Gang gesetzt werden, sind an verschiedenen Zelltypen untersucht worden: im hypotonen Milieu kompensieren Necturus-Gallenblasenepithelzellen (44, 103, 124, 125), Erythrozyten (85), Aszitestumorzellen (76), Zellen isolierter Kaninchentubuli (36, 62) und Froschhautepithelzellen (93) eine Vergrößerung des Zellvolumens durch eine Erhöhung des Kaliumchloridausstroms an der basolateralen Zellmembran. Die kompensatorische Verminderung des Volumens verschiedener Epithelzelltypen ist außerdem gebunden an das Vorhandensein von Calcium- und Chloridionen in der Badelösung (100, 136). Nach Untersuchungen an Amphiuma Erythrozyten (26) führt eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration durch das Ionophor A 23187 auch

ohne osmotischen challenge zu einem zellulären Verlust an Kalium, Chlorid und Wasser mit der Kinetik, die den Volumenregulationsvorgängen in einer hypotonen Umgebung entspricht. In diesem Fall soll der Chloridtransport durch einen Austausch von Chlorid gegen Bicarbonat zustande kommen. Dasselbe Ionophor erhöht die Kaliumleitfähigkeit an der apikalen Membran der Necturus-Gallenblasenzellen, bis sie schließlich unter den Normwert abfällt (102).

Diese Befunde mögen zu der Spekulation Anlaß geben, daß der transepitheliale Teilchentransport als Subphänomen einer volumenregulatorischen Antwort von Epithelzellen im Sinne einer gerichteten Teilchenextrusion nach osmotisch bedingter Anschwellung der Tubuluszellen im hypotonen Milieu anzusehen ist.

In Übereinstimmung mit Modellvorstellungen für andere leaky-Epithelien könnten Natrium- und Chloridionen in einem Cotransport gekoppelt über die apikale Membran in die Zelle eingeschleust werden, getrieben durch den elektrochemischen Gradienten für Natrium. In der Tat scheint dies der ubiquitäre Mechanismus für den Einwärtstransport von Natriumchlorid in Epithelzellen zu sein, da die Chloridaktivität in den Zellen der meisten Epithelien weit über dem Wert liegt, der dem elektrochemischen Gleichgewicht dieses Ions entspräche (29). Auf welche Weise die Chloridionen über die basolaterale Membrane transportiert werden, ist nicht bekannt. Auch wenn unsere Befunde für eine passive Permeabilität sprechen, so darf nicht außer Acht bleiben, daß an manchen Epithelien energieabhängige Chloridtransporte vermutet werden (25, 45, 46, 77, 99, 111).

Ferner sei auf Beobachtungen eines transepithelialen Chloridtransports verwiesen, der offenbar nicht durch Ouabain blockierbar war (67, 68, 96, 97, 140, 142).

Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die Natur des Elektrolytausstroms besser zu charakterisieren.

Unabhängig von den Befunden dieser Arbeit ist ein Zusammenhang zwischen dem hydrostatischen beziehungsweise osmotischen Gradienten und der tubulären Transportrate bereits mehrfach an Epithelien beschrieben worden:

In isoliert perfundierten Kaninchentubuli (32) fällt der Netto-Natriumtransport ab, wenn die Tubuli symmetrisch in hypertone Lösungen gebracht werden. Ähnliche Zusammenhänge werden an sogenannten "tight epithelia" (92) beobachtet.

Eine Erhöhung des hydrostatischen Druckes auf der peritubulären Seite um nur wenige Millimeter Quecksilbersäule vermindert den Flüssigkeitstransport am proximalen Tubulus drastisch (1, 8, 113). Unter vergleichbaren Bedingungen wird an der Kaninchengallenblase in vitro eine Abnahme des Flüssigkeitstransportes beobachtet, die mit einer deutlichen Abnahme des resorptiven und damit unidirektionalen Natriumflusses einhergeht, während sich das backleak nur geringfügig erhöht (42).

Der Volumenfluß an isoliert perfundierten Kaninchentubuli fällt ab, wenn peritubulär kein Protein angeboten wird: möglicherweise führt ein verminderter Abtransport von Resorbat aus den basolateralen Spalten zu einer Erhöhung des interstitiellen Drucks, womit der beschriebene Mechanismus zum Tragen käme (14, 16).

Analog zeigen Modellrechnungen (134) in Übereinstimmung mit Befunden an Gallenblasenepithelien (123), daß die basolateralen Spalten der Epithelien in überproportionaler Weise erweitert werden, wenn der interstitielle Druck serosal erhöht wird. Ursache ist eine lokale Erhöhung des Teilchengehalts im basolateralen Labyrinth wegen des verminderten Abtransports von Resorbat und konsekutiver Verschiebung von Wasser aus den Zellen in den Extrazellulärraum.

4.2. Theoretische Schlußfolgerungen

4.2.1. Der isotone Resorptionsmechanismus

Die hier vorgelegten Untersuchungen lassen wesentliche Merkmale des sogenannten "isotonen" Resorptionsmechanismus erkennen:

1. Da eine Nettovolumenresorption im proximalen Tubulus an einen osmotischen Gradienten über das Tubulusepithel gebunden ist, ist die Kopplung des Wassertransport an den Teilchentransport über den Mechanismus der Osmose wenn nicht bewiesen, so doch im höchsten Grad wahrscheinlich. Diese Theorie der Resorption ist mit allen bisher vorgeschlagenen Modellen des "isotonen Transports" kompatibel.

2. Wie oben dargestellt, widerlegen unsere Befunde die Vorstellung, das Epithel könne auf der "Blutseite" in den basolateralen Spalten ein hypertones Milieu aufrechterhalten ; dagegen spricht vor allem die Entkopplung von Wasser- und Teilchenresorption bei Perfusion hypertoner Lösungen (Segment I). Dieser Befund steht im Einklang mit den Wassertransportmodellen von Andreoli (5) und Spring (121), nicht aber mit den Modellen von Diamond und Bossert (38), Curran und Mac Intosh (35) oder Sackin und Boulpaep (112), die die gesamte osmotische Triebkraft oder einen wesentlichen Teil dieser Kraft in den basolateralen Spalten lokalisieren. Diese Modellen mögen durch einen Analogschluß von anderen "isoton" resorbierenden Epithelien wie der Gallenblase (138) oder dem proximalen Necturus-Tubulus (39) zustande gekommen sein.

Statt eines hypertonen Kompartiments im basolateralen Labyrinth erzeugt der Tubulus vielmehr ein hypotones

Milieu luminal durch initiale Teilchenresorption über vermutlich aktive Transportprozesse. Damit kann aus der gegebenen Plasmaosmolarität, die etwa der Osmolarität in den basolateralen Spalten entsprechen soll, sowie dem unter steady-state Bedingungen aufrechterhaltenen osmotischen Gradienten und dem dadurch bedingten Volumenfluß die hydraulische Leitfähigkeit des Epithels von der Lumen- zur Blutseite abgeschätzt werden. Sie beträgt etwa $P_f \approx 0.8 \text{ cm/sec}$ (siehe 6.1.11.).

Der Schlüsselbefund dieser Arbeit ist die Rückwirkung der luminalen Osmolarität auf die Teilchenresorption. Auch andere Autoren hatten bereits ein positives feedback des osmotisch getriebenen Wassertransports auf die Erzeugung eines solchen Gradienten beobachtet (3, 55), jedoch wurde dieses Phänomen bisher als solvent-drag Effect angesehen.

Um jedoch einen signifikanten solvent-drag Effekt zu erhalten, müßte ein Großteil der Wasserflüsse über die tight-junction Komplexe laufen. Diese Vorstellung ist aus folgenden Gründen unsinnig:

Aus den oben vorgestellten Widerstandsmessungen ergibt sich im günstigsten Fall, daß 10% der Gesamtfläche der tight-junction Komplexe aus Poren bestehen könnten, durch die Wasser mit den gelösten Natrium- und Chloridionen frei permeieren kann (siehe auch Anhang 6.1.10.). Bei einem durch solvent-drag Effekt zu erklärenden Reflexionskoeffizienten von 0,7 für Natrium und Chlorid bedeutet dies, daß fast ein Drittel des gesamten Volumenflusses über diese Poren erfolgen müßte. Dazu wären hydraulische Leitfähigkeiten in einer Höhe von mehreren Metern pro Sekunde erforderlich. Derart hohe Werte sind aber noch nie an biologischen Strukturen gemessen worden, was die Annahme eines relevanten Wassertransports über die tight-junctions ad absurdum führt.

Die Ablehnung eines signifikanten parazellulären durch den solvent-drag getragenen Elektrolyttransport stützt sich ferner auf Beobachtungen von Hierholzer und Mitarbeitern (74), die an isolierten Kaninchentubuli Reflexionskoeffizienten von 0.9 fanden. Unabhängig davon forderte die Arbeitsgruppe um Kokko (33, 80) einen Reflexionskoeffizienten nahe 1 für den parazellulären Transportweg, da durch experimentelle Erhöhung der peritubulären Osmolarität keinerlei solvent-drag Effekt zu erreichen war.

Bei der Gesamtsicht der Befunde muß, wie oben bereits für den Elektrolyttransport diskutiert wurde, ein fördernder Einfluß des transepithelialen osmotischen Gradienten auf den transzellulären Natriumchloridtransport vermutet werden. Da dieser noch unbekannte Mechanismus bei einer lumeneinwärts gerichteten hydraulischen Leitfähigkeit von etwa 0.1cm/sec (15, 104) die Nivellierung des osmotischen Gradienten längs des proximalen Tubulus verhindert (71, 90), muß er mit dem aktiven, vom Zellstoffwechsel unterhaltenen Elektrolyttransport in Beziehung stehen. So zeigten Green, Bishop und Giebisch (65), daß nach Zugabe von Zyanid die Natriumtransportrate des proximalen Tubulusepithels der Ratte bei Perfusion des Lumens mit einer high-chlorid Lösung abfällt. Zum selben Ergebnis kamen Chantrelle und Rector (30), als sie das peritubuläre Milieu von Tubuli an Kalium - einem Substrat der Natrium-Kalium-ATPase - verarmten.

4.2.2. Integrative Funktionen des "isotonen" Resorptionsmechanismus

Glomerulotubuläre Balance und peritubuläre Kontrolle

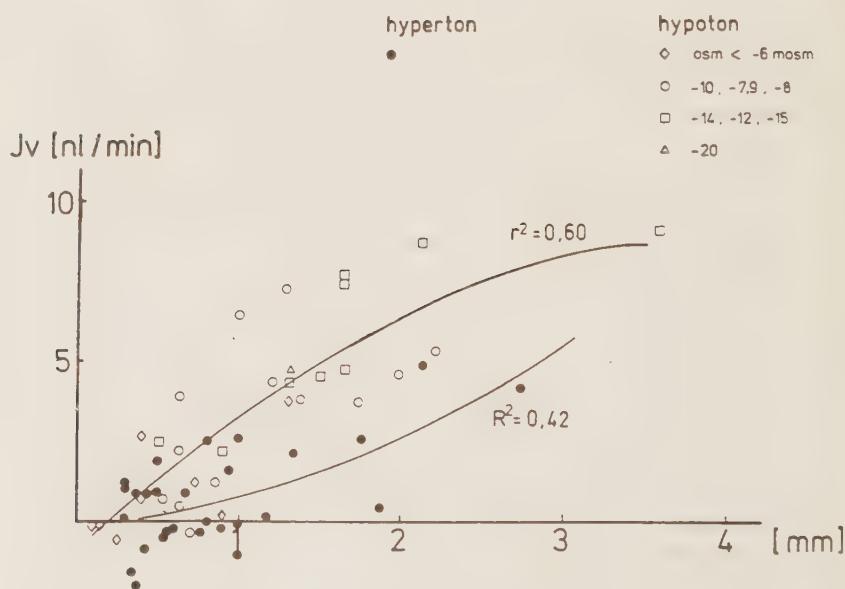
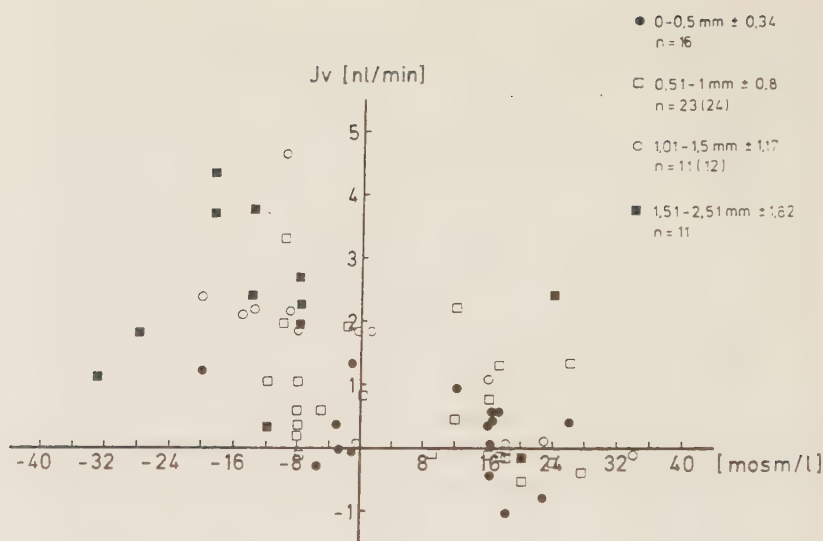
Aus den genannten Beobachtungen ist abzuleiten, daß künstliche Tubulusflüssigkeit nur dann mit physiologischen Raten resorbiert werden kann, wenn sie gegenüber dem Blutplasma kryoskopisch hypoton ist. Die stimulierende Wirkung der Hypotonizität auf den transepithelialen Elektrolyttransport wird aller Wahrscheinlichkeit nach vermittelt durch einen aktiven Transportmechanismus. Dieser Zusammenhang liefert erstmalig eine schlüssige Interpretation der Fähigkeit des proximalen Tubulusepithels, die Volumentransportrate bei Schwankungen der intratubulären Stromstärke proportional anzupassen. Dieses Phänomen, die sogenannte glomerulo-tubuläre Balance des proximalen Tubulus, wurde vielfach experimentell belegt (58, 70). Die Deutung dieses Mechanismus beruht auf der Annahme, daß die sogenannte teilchenfreie Wassermenge bei einer gegebenen Volumenstromstärke sich mit dem Zellkompartiment des nachfolgenden Tubulusepithels äquilibriert, dessen Größe als konstant anzusehen ist. Die luminale Osmolarität ist dann als Funktion der intraluminalen Stromstärke zu beschreiben (71), ebenso der transepitheliale Elektrolyttransport: das Stellglied, das die Einflußnahme der Stromstärke auf den Elektrolyttransport vermittelt, ist die intraluminale Osmolarität. Was immer auch die Detailmechanismen des Regelkreises sein mögen, die Steuerung der Flüssigkeitsresorption durch die intratubuläre Stromstärke läßt sich experimentell nur mit hypotoner, nicht aber mit hypertoner künstlicher Tubulusflüssigkeit reproduzieren.

In Abbildung 2 ist dies durch den Zusammenhang zwischen der Osmolarität der intratubulären Lösung, der Länge des resorbierenden Tubulusabschnitts und der Volumenresorptionsrate bei gegebener initialer Stromstärke (11.8 nl/min) gezeigt. Herausgehoben ist einmal die Abhängigkeit der kumulativen Volumenresorption vom initialen osmotischen Gradienten (mit verschiedenen Längenklassen), zum zweiten die kumulative Volumenresorption als Funktion der Resorptionsstrecke (aufgelistet nach Klassen verschiedener Osmolarität).

Wie vorhergesagt, nimmt die kumulative Volumenresorption bei Perfusion mit initial hypotoner Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung kontinuierlich ab parallel zum Rückgang der intratubulären Stromstärke mit wachsendem Abstand zur Perfusionsstelle. Bei Perfusion mit initial hypertoner Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung läßt sich dieser Zusammenhang nicht nachweisen.

Die Proportionalität zwischen Stromstärke und kumulativem Volumenfluß zeigt sich noch eindrucksvoller bei der Perfusion proximaler Tubulussegmente mit hypotoner Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung (siehe Abbildungen 2 und 3), wenn unterschiedliche Stromstärken vorgegeben werden. Die Aufschlüsselung der Daten dieser Messungen mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse beweist, daß die Resorptionsrate eine Funktion der Länge des perfundierten Segmentes, der initialen Stromstärke und des initialen osmotischen Gradienten ist (Häberle und Mitarbeiter, unveröffentlichte Befunde, siehe Abbildung 7). Mit isotonen Lösungen ist dagegen innerhalb der mikroperfundierbaren Tubulusstrecken keine eindeutige Abhängigkeit der Resorptionsrate von der initialen Stromstärke zu beobachten, wie die Literaturzitate in Abbildung 6 belegen.

Ergänzend sei auf die Tatsache verwiesen, daß eine Erhöhung des peritubulären interstitiellen Nettodrucks in der Regel die fraktionelle Resorption des proximalen



Jv [nl/min]

hypotone Gruppe

● 11,81 nl/min

○ 31,0 nl/min

$$J_v = -2,76 + 2,51(L) + -0,2(osm) + 0,13(V_0)$$

$$r = 0,75$$

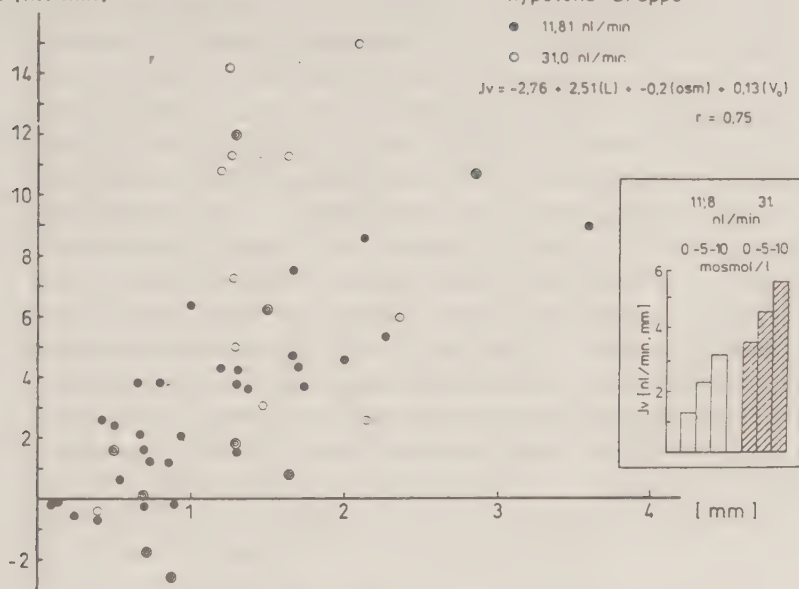


Abbildung 7

Die glomerulo-tubuläre Balance am proximalen Tubulus

(I) Abhängigkeit des transepithelialen Volumenflusses von der Osmolarität der luminalen Lösung

(II) Aufschlüsselung der in (I) gezeigten Daten nach der multiplen Regressionsanalyse

(III) Abhängigkeit des transepithelialen Volumenflusses vom osmotischen Gradienten und der perfundierten Strecke

(Häberle und Mitarbeiter; unveröffentlichte Befunde)

Tubulusepithels vermindert (1, 8, 14, 32, 42, 92, 113). Dies ist bei der hohen hydraulischen Leitfähigkeit des Epithels (respektive dem geringen transepithelialen osmotischen Gradienten) und der Abhängigkeit des transepithelialen Elektrolyttransports von einer luminalen Hypotonizität auch zu erwarten. Denn sollte der Wassertransport tatsächlich von einem osmotischen Gradienten in Höhe von etwa 85-100 mmHg getrieben werden, wie es die Befunde dieser Arbeit nahelegen, dann muß eine Erhöhung des peritubulären hydrostatischen Druckes durch Verminderung des osmotischen Gradienten den Wasserfluß und konsekutiv auch den Teilchenfluß über das Epithel verringern, zumal auch der Reflexionskoeffizient der basolateralen Zellmembran für Natriumchlorid etwa 0.5 betragen soll (137).

4.2.3. Der Chloridgradient als Triebkraft des Volumentransports

In engem Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Konzept steht die Frage, inwieweit der Chloridkonzentrationsgradient, der sich längs der proximalen superfiziellen (nicht aber juxtaglomerulären) Tubuli der Rattenniere aufbaut, zur Resorption von Wasser und Elektrolyten beiträgt. Zahlreiche Freiflußmikropunktionsstudien (31, 34, 41, 56, 61, 75, 81, 86, 88, 89, 94, 95, 119, 120, 128, 133, 143) haben gezeigt, daß die luminale Chloridionenkonzentration regelmäßig höher liegt als die Plasmakonzentration von Chloridionen, wobei dieser transepitheliale Gradient durch die präferentielle (aktive) Resorption von Bicarbonat in den frühproximalen Tubulussegmenten entstehen soll (11, 55, 84, 109).

Nach einem Vorschlag von Frömter, Rumrich und Ullrich (55) und später auch von Neumann und Rector (101) spielt der Chloridionengradient eine Schlüsselrolle bei der Absorption von Wasser und Salz in den mittel- bis spätproximalen Anteilen der Tubuli, die zu etwa 70% bis 80% passiv erfolgen soll. Die Triebkraft des Chloridgradienten erkläre sich dabei aus dem Absinken der effektiven⁶ Osmolarität der Tubulusflüssigkeit gegenüber dem Plasma trotz gleicher Teilchenkonzentration, was auf den im Vergleich zum Bicarbonat niedrigeren Reflexionskoeffizienten des Tubulusepithels für NaCl zurückzuführen sei. Der durch den effektiven osmotischen Gradienten induzierte Wasserfluß bedinge einen konvektiven Salztransport. Durch die Diffusion von Chlorid - entsprechend dem Konzentrationsgefälle vom Lumen zur Blutseite - entstehe ein lumenpositives Potential, das seinerseits nach den Gesetzen der Elektrodifffusion einen Natriumtransport induziere.

Zur Stützung dieser Hypothese führen die Autoren im wesentlichen zwei experimentelle Beobachtungen an:

Erstens kann das Tubulusepithel Lösungen von relativ zum Plasma höherer Chloridionenkonzentration aber niedrigerem Bicarbonatgehalt auch ohne Zusatz organischer Substanzen mit derselben Transportrate resorbieren wie eine Flüssigkeit, die in ihrer Zusammensetzung dem Ultrafiltrat entspricht. Wird jedoch der transepitheliale Chloridgradient nivelliert durch partiellen Ersatz von Chloridionen durch wenig resorbierbare Substanzen wie Zyklammat, Sulfat oder Methylsulfat, so fällt die Nettoflüssigkeitsresorption auf Werte um Null (101). Ähnliche Beobachtungen machten Lucci und Warnock (91), Green und Giebisch an der Ratte

⁶ Die treibende Kraft für die Wasserresorption in den Tubuli errechnet sich aus $J_v = L_p (\Delta p + \sum \sigma_i \cdot c_i)$; J_v ist die resorbierte Menge, L_p enthält die Fläche und Wasserdurchlässigkeit der Membranen, $\sigma_i \cdot c_i$ ist die Summe der Konzentrationsdifferenzen der einzelnen Substanzen mal deren Reflexionskoeffizient und entspricht dem effektiven osmotischen Gradienten (83).

in vivo (64, 65), sowie Jacobson (79) und Schafer et al (116) in vitro am proximalen Kaninchentubulus.

Zum zweiten sei das lumenpositive transepitheliale Potential vom Vorhandensein eines Chloridgradienten abhängig. Nachgewiesenermaßen ist die Potentialdifferenz bei luminaler Perfusion mit Plasmaultrafiltraten negativ (101).

Abgesehen davon, daß die oben angeführten Beobachtungen teilweise mehrdeutig sind- so wird in Lösungen mit Plasma-isotoner Chloridionenkonzentration, deren restliche Anionen durch Sulfat oder Gluconat ersetzt sind, nicht nur die Entstehung eines Chloridgradienten verhindert, sondern auch die effektive Osmolarität erhöht- zeigen die hier vorgelegten Befunde, daß der Chloridionengradient selbst keine Schlüsselfunktion für den transepithelialen Volumen-und Salztransport innehat. Die conditio sine qua non hingegen ist das Vorhandensein einer im Vergleich zum Plasma hypotonen intraluminalen Lösung, wie sie unter physiologischen Bedingungen bei der glomerulären Filtration durch den Gibbs-Donnan-Effekt entsteht (70). Erst wenn die kryoskopische Osmolarität der Tubulusflüssigkeit unter die entsprechende Osmolarität des Plasmas gefallen ist, treten eine signifikante Volumenresorption und ein lumenpositives Potential auf.

Da der spätproximale Chloridgradient nicht mit der Höhe der tubulären Volumenresorption korreliert ist (33, 71), scheint der von Neumann und Rector vorgeschlagene Mechanismus bestenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5. Zusammenfassung

Gegenwärtig wird die Erzeugung eines isotonen Resorbats im proximalen Tubulus der Rattenniere mit folgendem Modell erklärt:

Aktive Transportmechanismen akkumulieren Elektrolyte, im wesentlichen Natriumchlorid, in den basolateralen Spalten und erzeugen so einen transepithelialen osmotischen Gradienten, der die Resorption von Wasser aus dem Lumen in das basolaterale Labyrinth verursacht. Der Wasserfluß soll teils durch die Epithelzellen verlaufen, zum anderen Teil durch das Schlußleistennetz, den sogenannten tight-junction Komplexen. Während dieses Transportprozesses bleibe der Teilchengehalt des Resorbats nahezu isoton, einmal wegen der hohen Wasserpermeabilität des Epithels und zum anderen wegen eines "Mitschwemmens" von Elektrolyten beim Wasserfluß durch die Poren der tight-junction Komplexe (solvent-drag Effekt).

Gegen diese Hypothese sind grundsätzlich drei Einwände zu erheben:

1. Das Modell liefert keine Erklärung dafür, daß die Flüssigkeitsresorption des proximalen Tubulusepithels eine nahezu lineare Funktion der intratubulären Volumenstromstärke ist.

2. Unerklärt bleibt auch der Befund, daß bereits eine geringfügige Steigerung des hydrostatischen Druckes im Interstitium, zu dem auch das peritubuläre Milieu gehört, die Resorption im proximalen Tubulus beträchtlich vermindert.

3. Die Hypothese gründet sich auf die Annahme eines anteilmäßig hohen parazellulären Volumenflusses. Dies setzt eine hydraulische Leitfähigkeit von biologisch unsinniger Größe im Bereich der basolateralen Spalten voraus.

Da die hydraulische Leitfähigkeit des Schlußleistennetzes in der Tat viel zu niedrig ist, um Wasserflüsse mit konsekutivem solvent-drag zuzulassen, muß der Hauptanteil des Resorbats transzelluläre Transportwege nehmen. Dies setzt andererseits eine erhebliche (elektroneutrale) Natriumchlorid-Permeabilität der Tubuluszellen voraus. Da das Resorbat isoton bleibt, muß der transzelluläre Elektrolyttransport dem Wassertransport und dem diesen Wassertransport verursachenden osmotischen Gradienten über zelluläre Mechanismen angepasst werden.

Diese These im Verein mit der Annahme, daß das Kopplungskompartiment zwischen Teilchen- und Wassertransport nicht wie bisher vermutet basolateral lokalisiert ist, sondern luminal, bietet eine stringente Erklärung für die hohen Volumenfluxe im proximalen Tubulus bei einem nur geringen osmotischen Gradienten. Auch eine Interpretation der glomerulo-tubulären Balance und der peritubulären Kontrolle, zweier physiologischer Phänomene, die den Transport im proximalen Tubulus charakterisieren, ist mit Hilfe der oben angeführten Schlußfolgerungen möglich.

Wenn die genannte Arbeitshypothese richtig ist, müßten die Tubuluszellen eine erhebliche passive Elektrolytpermeabilität besitzen und künstliche Tubulusflüssigkeiten, die isoton oder hyperton zum Interstitium sind, mit geringerer Rate oder überhaupt nicht resorbieren.

Um diese Überlegung zu überprüfen, wurde in mikroperfundierten proximalen Tubulussegmenten die

Äquilibrierung von künstlichen Tubulusflüssigkeiten mit geringfügig hypertonem Teilchengehalt längs des perfundierten Segmentes verfolgt. Die transepithelialen Wasserflüsse und die trans- und parazellulären Elektrolytnettoflüsse wurden bei diesen Versuchen mit Hilfe von klassischen Bilanzierungstechniken und mittels elektrophysiologischer Methoden (Bestimmung von transepithelialen Potentialdifferenzen und des Ohmschen Widerstands) erfasst.

Die Experimente erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Luminal vorgegebene hypertone Lösungen äquilibrieren sich mit dem peritubulären Milieu vornehmlich durch den Ausstrom von Elektrolyten aus dem Lumen anstatt durch Wassereinstrom.

2. Ist die Äquilibrierung dieser Lösungen erfolgt, wird die luminale Flüssigkeit mit zunächst sehr geringer Rate, mit abnehmendem Teilchengehalt dann aber immer stärker resorbiert.

3. Der transepitheliale Ohmsche Widerstand, der als Maß für die parazelluläre Elektrolytpermeabilität gelten kann, wird anders als der Ionentransport von Änderungen des osmotischen Gradienten kaum beeinflusst. Daraus folgt, daß die den Wassertransport begleitenden Elektrolytflüsse über elektroneutral koppelnde Transportmoleküle verlaufen.

4. Die physiologische transepitheliale Spannung, die nach den Berechnungen dieser Arbeit als Diffusionspotential aufzufassen ist, läßt sich mit künstlichen Tubulusflüssigkeiten nur dann erzeugen, wenn die luminale Flüssigkeit hypoton ist im Vergleich zum peritubulären Milieu.

Wegen der unterschiedlichen partiellen Leitfähigkeiten der tight-junction Komplexe für die verschiedenen Ionenarten erfolgt der Spannungsabfall

des Diffusionspotentials am ehesten über die tight-junctions. Änderungen der Größe des Diffusionspotentials ergeben sich sowohl experimentell als auch mathematisch parallel zur Änderung der Tonizität der luminalen Flüssigkeit bei konstanter interstitieller Teilchenkonzentration. Folglich muß die Teilchendichte jenseits der tight-junction Komplexe weitgehend identisch sein mit der Konzentration des Interstitiums an Elektrolyten.

5. Mit hypotoner künstlicher Tubulusflüssigkeit läßt sich die glomerulo-tubuläre Balance imitieren, nicht dagegen mit hypertonen Lösungen.

Diese Befunde entsprechen weitgehend den Vorhersagen, die sich aus den angeführten Einwänden ergeben haben, und stützen das oben beschriebene modifizierte Modell der isotonen Resorption.

6.

Anhang

6.1. Tabellen und Berechnungen

- 6.1.1. Daten zur Messung des transepithelialen Fluxes
- 6.1.2. Daten zur Messung des transepithelialen Potentials
- 6.1.3. Daten zur Messung des transepithelialen Widerstands
- 6.1.4. Berechnung der liquid-junction-Potentiale
- 6.1.5. Berechnung der Meßbrücke
- 6.1.6. Berechnung der Diffusionspotentiale
- 6.1.7. Abschätzung der Äquilibrierungsprozesse in Segment I
- 6.1.8. Berechnung des transepithelialen Ohmschen Widerstands
- 6.1.9. Berechnung der Natriumionen- und Chlorid-Permeabilität aus dem Ohmschen Epithelwiderstand
- 6.1.10. Abschätzung der elektrisch leitenden parazellulären Porenfläche
- 6.1.11. Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit des proximalen Tubulusepithels

6.2. Materialien

6.2.1. Ringer- Lösung

6mM NaHCO_3 , 1mM Na_2SO_4 , 2mM Na_2PO_4 , 2,5mM CaCl_2 ,

4mM KCl, 1mM MgCl₂, 5mM Harnstoff, 141,25 mM NaCl.

6.2.2. Krebs-Henseleit-Lösung

Na₂HPO₄ 0,8mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, NaHCO₃ 25mM,
MgSO₄ 1mM, NaCl 119mM, KCl 5mM.

6.2.3. Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung

Na₂HPO₄ 0,8mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, NaHCO₃ 6mM,
MgSO₄ 1mM, NaCl 144mM, KCl 5mM.

6.3. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1

Versuchsanordnung bei der Messung des
transepithelialen Potentials und Widerstands

Abbildung 2

Perfusion mit hypertonen Lösungen:
Transepithelialer osmotischer Gradient,
transepithelialer Volumenfluß und kumulative
Teilchenresorption in drei Segmenten.
Das untere Diagramm zeigt den Verlauf der
Äquilibration eines osmotischen Gradienten in
Abhängigkeit von der hydraulischen Leitfähigkeit des
Epithels.

Abbildung 3

Dargestellt ist die Äquilibration eines
vorgegebenen osmotischen Gradienten über die
perfundierte Strecke.

Abbildung 4

Das transepitheliale Potential in Abhängigkeit
von der luminal vorgegebenen Lösung. Jede Linie
entspricht dem Potentialsprung beim Wechsel von
free-flow zu Perfusionsbedingungen bei der jeweils
luminal vorgegebenen Lösung.

Abbildung 5

Der transepitheliale Widerstand in Abhängigkeit
von der luminalen Tonizität

Abbildung 6

Der Transport im proximalen Tubulus in Abhängigkeit
von der luminalen Tonizität.

(Literaturzitate 55, 21, 98)

Abbildung 7

Die glomerulo-tubuläre Balance am proximalen
Tubulus

- (I) Abhängigkeit des transepithelialen
Volumenflusses am proximalen Tubulus von der
Osmolarität der luminalen Lösung
 - (II) Aufschlüsselung der in (I) gezeigten Daten nach
der multiplen Regressionsanalyse
 - (III) Abhängigkeit des transepithelialen
Volumenflusses vom osmotischen Gradienten und
der perfundierten Strecke
- (Häberle und Mitarbeiter, unveröffentlichte Befunde)

Abbildung 8

Berechnete Diffusionspotentiale in Abhängigkeit
vom osmotischen Gradienten.

6.1.1.

Tabelle 1 Flußmessungen und Messungen der intraluminalen Osmolarität

A. Initiale Segmente (Länge 0.39 ± 0.07 mm)

$\dot{V}_O$	J_V	$\bar{V}(x)$	$C_{osm(pl)}$	$C_{osm(0)}$	$C_{osm(x)}$	$\dot{V}_O \cdot C_{osm(0)}$	$\dot{V}(x) \cdot C_{osm(x)}$
11.31	0.74	10.57	298	314	307	3551.3	3249
11.31	0.8	10.51	298	314	300	3551.3	3153
11.31	0.09	11.02	298	314	287	3551.3	3163.3
11.31	-0.95	12.26	298	314	299	3551.3	3665.7
12.93	0.89	12.04	288	314	289	4060	3479.6
12.93	-1.6	14.53	291	314	280	4060	4068.4
11.31	1.03	10.28	296.5	314	297	3551.3	3053.2
11.31	1.15	10.16	296.5	314	297	3551.3	3017.5
11.31	-2.01	13.32	296	314	296.7	3551.3	3952
11.31	1.98	9.33	302	314	280	3551.3	2612.4
12.35	-0.61	12.96		291	292		
12.35	0.74	11.61		291	302		
12.35	-0.1	12.45		291	301		
12.35	-0.13	12.48		291	292		
12.35	2.65	9.7		291	287		

Teilchenfluß: $(312 \pm 388) \cdot 10^{-12}$ Osmol/min n=10

Volumenfluß: 0.23 ± 1.31 nl n=10

$C_{osm(pl)} - C_{osm(x)} : 2.93 \pm 8.99$ mosmol/l n=10

Die Berechnung des Teilchenflusses erfolgt über folgende Formel:

$$\dot{V}_O \cdot C_{osm(0)} - \dot{V}(x) \cdot C_{osm(x)}$$

Der Teilchenfluß bei Perfusion mit hypertonen Lösungen ist signifikant verschieden von Null ($p < 0.05$).

Der Volumenfluß und der osmotische Gradient an der Sammelstelle bei Perfusion mit hypertonen Lösungen sind nicht signifikant verschieden von Null.

B. Mittlere Segmente (Länge 0.81 ± 0.16 mm)

$\bar{V}_O$	J_V	$\bar{V}(x)$	$C_{osm(pl)}$	$C_{osm(O)}$	$C_{osm(x)}$	$\bar{V}_O \cdot C_{osm(O)}$	$\bar{V}(x) \cdot C_{osm(x)}$
11.31	2.58	8.73	297	314	311	3551.3	2715
11.31	1.55	9.76	298	314	304	3551.3	2967
11.31	-1.06	12.37	294	314	275	3551.3	3402
11.31	-0.29	11.60	298	314	296.2	3551.3	3459
12.93	2.62	10.31	288	314	291	4060	3000
12.93	-0.52	13.45	290	314	289	4060	4008
12.04	-0.28	12.32	305	314	281	3781	3462
11.31	-0.10	11.41	296	314	297.7	3551.3	3397
11.31	-0.26	11.57	296	314	297.8	3551.3	3446
11.31	0.97	10.34	302	314	302	3551.3	3923

Teilchenfluß: $(414 \pm 334) \cdot 10^{-12}$ Osmol/min $n=10$
 Volumenfluß: 0.52 ± 1.32 nl/min $n=10$
 $C_{osm(pl)} - C_{osm(x)} : -1.73 \pm 11.33$ mosmol/l $n=10$

Der Teilchenfluß bei Perfusion mit hypertonen Lösungen ist signifikant verschieden von Null ($p < 0.05$).
 Der Volumenfluß und der osmotische Gradient an der Sammelstelle bei Perfusion mit hypertonen Lösungen sind nicht signifikant verschieden von Null.

C. Späte Segmente (Länge 1.8 ± 0.62 mm)

$\bar{V}_O$	J_V	$\bar{V}(x)$	$C_{osm(pl)}$	$C_{osm(O)}$	$C_{osm(x)}$	$\bar{V}_O \cdot C_{osm(O)}$	$\bar{V}(x) \cdot C_{osm(x)}$
11.31	4.12	7.19	296.5	314	297.3	3551.3	2138
11.31	2.49	8.82	296	314	289	3551.3	2549
11.31	0.01	11.3	296	314	294	3551.3	3322
12.93	0.15	12.78	291	314	287	4060	3668
12.93	4.91	8.02	290	314	277	4060	2221
11.30	0.40	10.9	294	314	284	3548.2	3097

Teilchenfluß: $(888 \pm 642) \cdot 10^{-12}$ Osmol/min $n=6$
 Volumenfluß: 2.01 ± 2.15 nl/min $n=6$
 $C_{osm(pl)} - C_{osm(x)} : -5.87 \pm 5.14$ mosmol/l $n=6$

Der Teilchenfluß bei Perfusion mit hypertonen Lösungen ist signifikant verschieden von Null ($p < 0.005$) und signifikant größer als der Teilchenfluß in den initialen Segmenten ($p < 0.05$).

Der Volumenfluß und der osmotische Gradient an der Sammelstelle bei Perfusion mit hypertonen Lösungen sind in den späteren Segmenten signifikant verschieden von Null ($p < 0.05$).

$\dot{V}_0$: Perfusionsstromstärke

J_v : transepithelialer Volumenfluß

$\dot{V}_{(x)}$: Volumenstromstärke an der Sammelstelle

$C_{\text{osm}}(p_1)$: Osmolarität des Plasmas

$C_{\text{osm}}(0)$: Osmolarität der Perfusionslösung

$C_{\text{osm}}(x)$: Osmolarität der gesammelten Flüssigkeit

6.1.2.

Tabelle 2

Messungen des transepithelialen Potentials

Perfusions- lösung	Spätproximale Potentialdifferenz (mV)		Frühproximale Potentialdifferenz (mV)	
	Free Flow	Perfusion	Free Flow	Perfusion
(1)	0.64 ± 0.35 (n=24)	-0.28 ± 0.32 (n=24)	-0.8 ± 0.34	-0.68 ± 0.2
(2)	1.39 ± 0.39 (n=7)	-0.02 ± 0.26 (n=7)		
(3)	1.67 ± 0.26 (n=15)	0.66 ± 0.19 (n=15)	-0.97 ± 0.33	0.56 ± 0.49
(4)	1.06 ± 0.34 (n=20)	0.97 ± 0.22 (n=20)		
(5)	0.49 ± 0.20 (n=12)	-0.63 ± 0.35 (n=12)		
(6)	0.57 ± 0.31 (n=13)	-0.52 ± 0.36 (n=13)		

- (1) hypertone Krebs-Henseleit-Lösung
 (2) hypotone Krebs-Henseleit-Lösung
 (3) hypertone Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung
 (4) hypotone Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung
 (5) hypertone Krebs-Henseleit-Lösung mit 5mM Glucose
 (6) hypotone Krebs-Henseleit-Lösung mit 5 mM Glucose

Nach dem t-test für unverbundene Stichproben ($p=0.05$) ergibt sich ein signifikanter Abfall des Potentials bei allen Lösungen mit Ausnahme von (4).

	Free Flow			Perfusion		
	PD_V (mV)	PD_j (mV)	R (Ohm)	PD_V (mV)	PD_j (mV)	R (Ohm)
(1)	+1.0	+0.4	14K	+1.2	+0.9	14K
	+0.9	+1.1	16K	-0.1	+0.4	16.5K
	+0.9	+1.2	19K	0	+0.7	18K
	+0.9	+0.6	12K	+0.7	+0.2	12K
	+1.0	+1.4	18K	-0.25	+0.2	14K
(2)	+0.6	+0.8	20K	-1.0	0	22K
	0	+1.0	9K	-1.5	-1.0	9K
	+0.4	+1.1	22K	-0.7	-1.6	22K
	+0.8	+0.2	19K	-0.6	-0.1	20K
	-0.5	-0.4	9.5K	+0.6	+0.4	10K
	+0.9	+0.6	6K	+0.1	+0.1	9K
	+0.6	-0.8	15K	+0.2	+0.3	15K
	+1.3	+0.9	20K	+0.5	0	22K
	+0.5	+1.2	12K	-0.2	-0.2	14K
	+0.4	+0.2	7K	-0.2	0	7K
	+0.2	+0.4	13K	-0.4	-0.4	12.5K
	+0.9	+0.8	13K	+0.1	+0.3	13K
	+1.2	+1.0	12.5K	+0.6	+0.6	12K
	+0.8	+0.9	22K	+0.2	+0.9	22K
	+0.3	+0.3	9.5K	0	0	9.5K
	+0.4	+0.65	9K	+0.2	+0.2	8K
	+1.3	+1.0	29K	+0.4	+0.6	24K
	+0.8	+0.6	22K	-0.2	-0.2	20K
	+0.4	+0.4	15K	+0.2	0	15K

(1) hypertone Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung

(2) hypotone Krebs-Henseleit-Chlorid-Lösung

 PD_V : transepitheliales Potential PD_j : transepitheliales Potential nach Einspeisung
von 10^{-7} A intraluminal

6.1.4.

Berechnung der liquid-junction-potentials

Nach der von Barry und Diamond modifizierten Nernst-Planck-Henderson Gleichung berechnen sich die liquid-junction-potentials nach folgendem term:

$$E_L = \frac{RT}{F} \frac{\sum (u_i/z_i)(a_i^+ - a_i^-)}{\sum u_i (a_i^+ - a_i^-)} \cdot \ln \frac{\sum a_i^+ u_i}{\sum a_i^- u_i}$$

R: Gaskonstante

T: absolute Temperatur

F: Faraday-Konstante

$u = \lambda_i^0$: limiting-conductivity

$a = \gamma \cdot c$

c: molare Konzentration

γ : Aktivitätskoeffizient

Konstanten wurden entnommen aus Robinson R.A. und Stokes R.H., "Electrolyte Solutions", Butterworths, London, 1959.

A. Lösung I : 1M KCL

Lösung II : 150mM NaCl bei 25°C

$$E_L = \frac{(273.16 + 25) \cdot 1000 \cdot 8.31439}{96522} \cdot \frac{73.5 (0.1 \cdot 0.604) + 76.35 (0.15 \cdot 0.756 - 0.604 \cdot 1)}{73.5 (0.1 \cdot 0.604) + 76.35 (0.15 \cdot 0.756 - 0.604 \cdot 1)} \cdot \ln \frac{0.604 \cdot 1 \cdot 73.5 + 0.604 \cdot 1 \cdot 76.35}{0.15 \cdot 0.756 \cdot 50.1 + 0.15 \cdot 0.756 \cdot 76.35}$$

$$= 47.32 \text{ mV}$$

B. Lösung I : 150 mM NaCl

Lösung II : NaCl-Lösung mit
0.03 M Na-Bicarbonat

bei 35°C

$$E_1 = \frac{(273.16 + 35) \cdot 1000 \cdot 8.31439}{96522} \cdot \frac{61.5(0.143 \cdot 0.756 - 0.143 \cdot 0.756)}{61.5(0.143 \cdot 0.756 - 0.143 \cdot 0.756)}$$

$$\frac{-92.2(0.113 \cdot 0.771 - 0.143 \cdot 0.756) - 52.5(0.03 \cdot 0.85)}{+92.2(0.113 \cdot 0.771 - 0.143 \cdot 0.756) + 52.5(0.03 \cdot 0.85)}$$

$$\cdot \ln \frac{61.5 \cdot 0.1438 \cdot 0.756 + 92.2 \cdot 0.1138 \cdot 0.771 + 52.5 \cdot 0.03 \cdot 0.85}{61.5 \cdot 0.1438 \cdot 0.756 + 92.2 \cdot 0.1438 \cdot 0.756}$$

$$= -0.96 \text{ mV}$$

C. Lösung I : 150mM NaCl

Lösung II : NaCl-Lösung mit
0.01 M Na-Bicarbonat

bei 35°C

$$E_1 = \frac{(273.15 + 35) \cdot 1000 \cdot 8.31439}{96522} \cdot \frac{-92. (0.133 \cdot 0.76 - 0.1438 \cdot 0.756) -}{+92. (0.133 \cdot 0.76 - 0.1438 \cdot 0.756) +}$$

$$\frac{-52.5(0.01 \cdot 0.9 - 0)}{+52.5(0.01 \cdot 0.9 - 0)} \cdot \ln \frac{61.5 \cdot 0.1438 \cdot 0.756 + 92. \cdot 0.133 \cdot 0.76 +}{61.5 \cdot 0.1438 \cdot 0.756 + 92. \cdot 0.1438 \cdot 0.756}$$

$$+ \frac{52.5 \cdot 0.9 \cdot 0.01}{}$$

$$= -0.37 \text{ mV}$$

D. Lösung I : NaCl

10 mM NaHCO_3

Lösung II : NaCl

25 mM NaHCO_3

bei 35°C

$$E_1 = \frac{(273.15 + 35) \cdot 1000 \cdot 8.31439}{96522} \cdot \frac{-92.2 \cdot (0.118 \cdot 0.76 - 0.113 \cdot 0.76) -}{+92.2(0.118 \cdot 0.76 - 0.113 \cdot 0.76) +}$$

$$\frac{-52.5(0.025 \cdot 0.84 - 0.01 \cdot 0.9)}{+52.5(0.025 \cdot 0.84 - 0.01 \cdot 0.9)} \cdot$$

$$\ln \frac{61.5 \cdot 0.1438 \cdot 0.756 + 92.2 \cdot 0.118 \cdot 0.76 + 52.5 \cdot 0.025 \cdot 0.84}{61.5 \cdot 0.1438 \cdot 0.756 + 92.2 \cdot 0.113 \cdot 0.76 + 52.5 \cdot 0.01 \cdot 0.9}$$

$$= 0.69 \text{ mV}$$

E. Lösung I : NaCl (isoton)

Lösung II : spätproximale
Tubulusflüssigkeit,
Krebs-Henseleit-
Lösung mit
10 mM NaHCO_3

bei 35°C

$$E_1 = \frac{(273.15 + 35) \cdot 1000 \cdot 8.31439}{96522} \cdot$$

$$\frac{50.1(0.145 \cdot 0.756 - 0.15 \cdot 0.756) + 73.5 \cdot 0.005 \cdot 0.93 + \frac{59.5}{2} \cdot 0.002 \cdot 0.95 +}{50.1(0.145 \cdot 0.756 - 0.15 \cdot 0.756) + 73.5 \cdot 0.005 \cdot 0.93 + 59.5 \cdot 0.002 \cdot 0.95 +}$$

$$\frac{\frac{53}{2} \cdot 0.001 \cdot 0.95 - 76.35(0.143 \cdot 0.756 - 0.15 \cdot 0.756) - 44.5 \cdot 0.001 \cdot 0.9}{53 \cdot 0.001 \cdot 0.95 + 76.35(0.143 \cdot 0.756 - 0.15 \cdot 0.756) + 44.5 \cdot 0.001 \cdot 0.9}$$

$$\frac{70 \cdot 0.001 \cdot 0.95 - \frac{80}{2} \cdot 0.001 \cdot 0.95}{70 \cdot 0.001 \cdot 0.95 - 80 \cdot 0.001 \cdot 0.95}$$

$$\cdot \ln \frac{50.1 \cdot 0.145 \cdot 0.756 + 73.5 \cdot 0.05 \cdot 0.93 + 59.5 \cdot 0.02 \cdot 0.95 +}{(50.1 + 76.35) \cdot 0.756 \cdot 0.15}$$

$$\frac{53 \cdot 0.001 \cdot 0.95 + 76.35 \cdot 0.143 \cdot 0.756 + 44.5 \cdot 0.001 \cdot 0.9 + 70 \cdot 0.001 \cdot 0.95 +}{80 \cdot 0.001 \cdot 0.95}$$

$$\frac{80 \cdot 0.001 \cdot 0.95}{80 \cdot 0.001 \cdot 0.95}$$

$$= -0.44 \text{ mV}$$

6.1.5.

Aufbau der Meßbrücke

AgAgCl	KCl	KCl Agar	Ringer	Ringer Agar	Ringer	AgAgCl
U_1	U_2	U_3	U_4	$-U_5$	$-U_6$	

$$U = \sum U_n$$

$$U_1 = 235 \text{ mV}$$

$$U_2 = 0 \text{ mV}$$

$$U_3 = 47.3 \text{ mV}$$

$$U_4 = 0 \text{ mV}$$

$$U_5 = 0 \text{ mV}$$

$$U_6 = 233 \text{ mV}$$

$$U = 49.3 \text{ mV}$$

Berechnung der Diffusionspotentiale

A. Vergleich verschiedener Methoden zur Berechnung des transepithelialen Diffusionspotentials

1. Methode nach Hebert, Schafer und Andreoli (73)

$$(I) \quad \Delta \varphi = - \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{P^+ \cdot C^{+''} + P^- \cdot C^{-'}}{P^+ \cdot C^{+'} + P^- \cdot C^{-''}}$$

(modifizierte Goldman-Hodgkin -
Katz - Gleichung)

$$(II) \quad i = \frac{1}{R_j} \cdot (V_M - E_j) \quad \begin{array}{l} V_M: \text{Membranpotential} \\ E_j: \text{Gleichgewichtspotential} \end{array}$$

(Ohmsches Gesetz)

$$(III) \quad g_m = \sum g_i \quad \begin{array}{l} g_i: \text{partielle Leitfähigkeit} \\ \text{des Ions } i \end{array}$$

(III in II, unter Gleichgewichtsbedingungen, das heißt: $i=0$)

$$V_M = \sum \frac{g_i}{g_m} E_j = \sum t_j \cdot E_j \quad (IV) \quad t_j: \text{Überföhrungszahl} \quad \begin{array}{l} \text{(siehe B.)} \end{array}$$

$$(I \text{ in } IV) \quad V_M = \sum t_j \cdot \left(- \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \ln \frac{C_j^{'}}{C_j^{''}} \right)$$

2. Methode nach Laprade und Cardinal (27)

$$(I) \quad \varphi = \varphi^{\cdot} - \varphi^{''} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{(P_{Na} / P_{Cl}) C_{Na}^{''} + C_{Cl}^{'}}{(P_{Na} / P_{Cl}) C_{Na}^{'} + C_{Cl}^{''}}$$

(Goldman-Gleichung)

$$(II) \quad r_{Na} = \frac{C_{Na}^{''}}{C_{Na}^{'}} \quad r_{Cl} = \frac{C_{Cl}^{'}}{C_{Cl}^{''}} \quad m = (P_{Cl} / P_{Na}) \cdot C_{Cl}^{'}/C_{Na}^{'}$$

$$(II \text{ in } I) \quad \varphi = \frac{R \cdot T}{F} \cdot (r_{Na} - 1) \frac{1 + m(r_{Cl} - 1) / r_{Na}^{-1}}{1 + m}$$

3. Methode nach Berry und Rector (18)

$$V_T = -E_{Na(T)} \cdot \frac{(1-Q_1) \cdot (1+Q_2) \cdot \left(\frac{1+D_1}{1+D_2} \right) \times}{(1-Q_1) \cdot Q_2 + (1-Q_2) \cdot Q_1 \cdot \left(\frac{1+P_1}{1+P_2} \right) \times}$$

$P_1 := P_{Na}/P_{Cl}$ der junctional complexes

$$E_{Na(T)} = \frac{-R \cdot T}{F} \cdot \frac{Na \text{ (luminal)}}{Na \text{ (basolateral)}}$$

$$Q_1 = (1+P_1)/(1-P_1)$$

P_2 ist die relative Beweglichkeit von Na^+ und Cl^- in freien Lösungen: bei 39 °C für 150mM NaCl 0,63

$$Q_2 = (1+P_2)/(1-P_2)$$

Die Methode nach Berry und Rector berücksichtigt anders als die Berechnung nach Frömter auch den Widerstand der parazellulären Spalten.

Jedoch gehen in die Gleichung, die Berry und Rector beschreiben, lediglich die Permeabilitäten von Natrium- und Chloridionen ein. Auch bei der Berechnung des Potentials nach Cardinal und Laprade wird die Permeabilität von Bicarbonationen vernachlässigt.

Die Berechnung des Diffusionspotentials erfolgt deshalb im weiteren nach der Methode von Hebert, Schafer und Andreoli, die die Permeabilität von Bicarbonat miteinander bezieht.

8. Tabelle der Überführungszahlen und Relativen Permeabilitäten

Überführungszahlen

	t_{Na}	t_{Cl}	t_{HCO_3}
Frömter, Müller, Wick (54)	0.57	0.4	0.03
Seely, Boulpaep (119)	0.58	0.42	
De Mello, Lopes, Malnic (37)	0.6	0.4	

Relative Permeabilitäten

	P_{Na}	P_{Cl}	P_{HCO_3}
Frömter, Müller, Wick (54) (Ratte)	1.22	1	0.5
Seely, Boulpaep (119) (Hund)	1.38	1	
De Mello, Lopes, Malnic (37) (Ratte)	1.5	1	
Laprade, Cardinal (27) (Kaninchen, in vitro)	1.1	1	
Berry, Rector (18) (Kaninchen, in vitro)	1	0.5	

C. Berechnung der transepithelialen Diffusionspotentiale
bei unterschiedlichen osmotischen Gradienten und
unterschiedlichem Chloridgehalt

Unter Berücksichtigung des Donnan-Faktors ergeben sich
folgende Werte für die intraluminalen bzw. interstitiellen
Ionenkonzentrationen bei Isotonie:

	Na^+	Cl^-	HCO_3^-	
Blut	140.6	112.3	25.0	
Lumen	145.8	123.0	26.0	(KH-Bicarbonat-Lösung)
Lumen	145.8	147.0	6.0	(KH-Chlorid-Lösung)

Nach Hebert, Schafer und Andreoli beschreibt folgende
Gleichung das transepitheliale Diffusionspotential:

$$V_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \left(0.57 \cdot \ln \frac{140.6}{145.8} + 0.4 \cdot \ln \frac{C_{\text{Cl}}}{112.3} + 0.03 \cdot \ln \frac{C_{\text{HCO}_3}}{25} \right)$$

Bei Variation der luminalen Osmolarität ohne Änderung
des relativen Ionengehalts ergeben sich folgende Potential=
werte (mV):

	KH-Bicarbonat	KH-Chlorid
Gradient +20	0.21	0.92
Gradient +15	0.27	0.99
Gradient +10	0.32	1.06
Gradient +5	0.38	1.11
Gradient 0	0.45	1.17
Gradient -5	0.51	1.24
Gradient -10	0.58	1.29
Gradient -15	0.65	1.37
Gradient -20	0.70	1.44

Berechnete Diffusionspotentiale

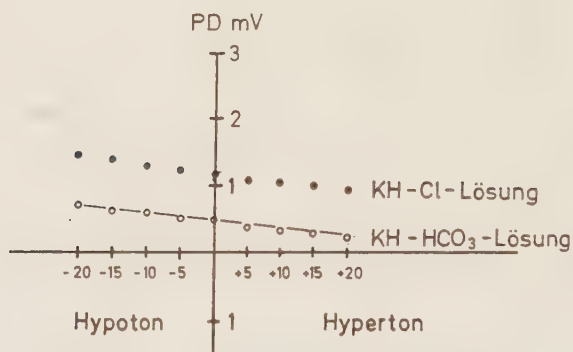


Abbildung 8 Berechnete Diffusionspotentiale
in Abhängigkeit vom osmotischen
Gradienten

6.1.7.

Abschätzung der Äquilibrierungsprozesse im initialen Segment (I)

Experimentelle Bedingungen: Perfusion der proximalen Tubulussegmente mit hypertoner Chlorid-Krebs-Henseleit-Lösung (314 mosmol/l bei einer mittleren Plasmaosmolarität von 296 mosmol/l), die initiale Volumenstromstärke betrug 11.8 nl/min.

Errechnung des Teilchenflusses unter der Annahme, daß der Wasserausstrom vernachlässigbar klein ist:

$$J_i = -P_i \cdot (\Delta c_i + z \cdot \bar{c}_i \cdot \Delta \varphi) + \text{aktiver term}$$

Berechnung der Lineargeschwindigkeit und Kontaktzeit im perfundierten Segment (I), das eine mittlere Länge von 0.39mm hat:

$$\frac{11.8 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3}{10 \cdot 10 \cdot 314 \mu\text{m}^2 \cdot \text{sec}} = \frac{626 \mu\text{m}}{\text{sec}}$$

Die Strecke von 0.39mm wird dann in 0.62 sec passiert.

Berechnung des passiven Chloridfluxes in diesem Segment:

Formel für den unidirektionalen Fluß:

$$P \cdot (9.581) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec} = \frac{11.8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3}{60 \cdot 0.039} \cdot \ln \frac{9}{x}$$

$$x = 7.44$$

Anmerkung: Die Permeabilitätskonstante wurde korrigiert um die Fraktion des Flusses, die auf Elektrophorese zurückzuführen ist. Dazu wurde der elektrochemische Gradient aus dem transepithelialen Potential errechnet und vom chemischen Gradienten subtrahiert.

Der Korrekturfaktor entspricht dem Quotienten

aus dem chemischen Gradienten und dieser Differenz.

Ergebnis: Die Chloridkonzentration kann sich durch Diffusion in 0.39 mm langen Segmenten nur von 156 mM auf 154.4 mM verringern.

Berechnung des passiven Natriumfluxes in diesem Segment:

Formel für den unidirektionalen Fluß:

$$26.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec} = \frac{11.8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3}{60 \text{ sec} \cdot 0.039 \text{ cm}} \cdot \ln \frac{8.7}{x}$$

$$x = 5.33$$

Ergebnis: Die Natriumionenkonzentration kann sich durch Diffusion in 0.39 mm langen Segmenten nur von 153.3 mM auf 150.3 mM verringern.

Zusammenfassend zeigt sich, daß sich die Osmolarität durch Diffusion höchstens um 5 mosmol/l verringert.

Berechnung des transepithelialen Ohmschen Widerstandes (Kabelanalyse)

Zwischen dem Eingangswiderstand $\frac{V(x)}{I_0}$ und der Tubulusgeometrie $r^2 \cdot \pi$ sowie der Längenkonstanten, die die Abnahme von Strom (I_0) und Spannung (V) längs des Tubulus beschreibt, besteht folgender Zusammenhang:

$$\frac{V(x)}{I_0} = \frac{1}{2} \frac{\rho}{r^2 \cdot \pi} \cdot \lambda e^{-x/\lambda}$$

$$\rho = \frac{R \cdot F}{1} \quad (\text{spezifischer Längenwiderstand})$$

Der Mittelwert des Eingangswiderstands aus den Messungen der hypotonen Gruppe (siehe 6.1.3.) beträgt 15.34 kOhm. Die mittlere Entfernung zwischen der Strominjektionskapillare und der Meßkapillare beträgt 80 +/- 24 μm . Bei einem Tubulusradius von 10 μm und einem spezifischen Längenwiderstand von 64 Ohm $\cdot$ cm ergibt sich λ als 55 μm .

Der spezifische Wandwiderstand ergibt sich dann aus

$$R_m = 4 \rho \cdot \lambda^2 / 2r$$

Ergebnis: Der spezifische Wandwiderstand des proximalen Tubulusepithels beträgt 3.87 Ohm $\cdot$ cm².

Anmerkung: In der isotonen Gruppe (siehe 6.1.3.) ergaben sich mit einer Längenkonstante von 54 μm , einem mittleren Abstand von 70 μm zwischen der Strominjektions- und Meßelektrode und einem mittleren Eingangswiderstand von 15.8 +/- 2.8 kOhm praktisch identische Werte.

(Formeln aus:

"Electrolyte transport across renal tubular membranes"
Giebisch, G., Windhager, E.E. in
Handbook of Physiology, Section 8, pp 315-376,
ed. J. Orloff und R.W. Berliner,
Baltimore, Maryland, USA, 1973)

6.1.9.

Berechnung der Permeabilität für Natrium- und Chloridionen aus dem Ohmschen Epithelwiderstand (48)

Nach der Theorie der irreversiblen Thermodynamik läßt sich die Permeabilität eines Epithels für ein Ion i nahe dem elektrochemischen Gleichgewicht folgendermaßen beschreiben, wenn kein aktiver Transport dieses Ions und kein Nettowassertransport stattfinden:

$$P_i = \frac{L_{ii} \cdot R \cdot T}{\bar{c}_i} \quad (1)$$

Die elektrische Leitfähigkeit eines Epithels $\frac{I}{\Delta PD} = g$ läßt sich mit Hilfe der Überföhrungszahlen in Teilleitfähigkeiten zerlegen:

$$t_i = \frac{g_i}{g} \quad ; \quad \sum_{i=1}^K t_i = 1 \quad (2)$$

$$g_i = L_{ii} \cdot z^2 \cdot F^2 \quad (3)$$

Aus (1) und (3) ergibt sich dann die Permeabilität ausgedrückt in Parametern der Elektrizität:

$$P_i = \frac{g_i \cdot R \cdot T}{\bar{c}_i \cdot z^2 \cdot F^2} \quad \left[\frac{\text{cm}}{\text{sec}} \right] \quad ; \quad R = \frac{10^7 \text{ Wsec}}{\text{K mol}}$$

Mit einer Gesamtleitfähigkeit von $3.84 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ und einer Überföhrungszahl von 0.57 ergibt sich als Natriumpermeabilität:

$$\frac{\frac{1}{3.84} \cdot 0.57 \cdot 8.3 \cdot 310}{144.5 \cdot 96522^2} \cdot 2\pi \cdot 0.001 = 17.83 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

Für die Chloridpermeabilität ergibt sich:

$$\frac{\frac{1}{3.84} \cdot 0.4 \cdot 8.3 \cdot 310}{131.1 \cdot 96522^2} \cdot 2\pi \cdot 0.001 = 13.78 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

6.1.10.

Abschätzung der elektrisch leitenden parazellulären Porenfläche

Die parazelluläre Porenfläche entspricht einem Anteil des Kittleistennetzes an der luminalen Tubulusfläche. Der fraktionale Anteil der Kittleistenfläche an der inneren Mantelfläche des Tubulus beträgt 10^{-4} . Der Widerstand dieses Kittleistennetzes errechnet sich folgendermaßen aus dem spezifischen Kabelwiderstand und dem gemessenen Widerstand R, wenn man annimmt, daß die Dicke der Kittleisten $120 \text{ \AA} = 120 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}$ entspricht:

$$R = \frac{64 \cdot 120 \cdot 10^{-8}}{2 \cdot \pi \cdot 0.001 \cdot 10^{-4}}$$

$$R = 122.2 \text{ Ohm}$$

Ergebnis: Der Widerstand der Kittleistenfläche eines 1cm langen Tubulusabschnitts beträgt 122 Ohm, wenn man davon ausgeht, daß die Poren von Kochsalzlösung mit einer Dicke von $120 \text{ \AA}$ eingenommen werden.

Zwischen dem spezifischen Wandwiderstand und dem gemessenen Eingangswiderstand R besteht andererseits der Zusammenhang:

$$R = \sigma \cdot \frac{1}{F}$$

Bei einem spezifischen Wandwiderstand von $3.87 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ entspräche dies bei einem Widerstand von 616 Ohm. Dieser Widerstand erklärt sich bei einem Porenanteil von 20% an der Kittleistennetzfläche. Umgerechnet auf die gesamte Tubulusinnenwand entspricht dies einer fraktionellen Porenfläche von 0,00002.

Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit (15)

- A. Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit des proximalen Tubulus, wenn der osmotische Gradient konstant etwa 6 mosmol/l beträgt und etwa 3 nl/min·mm resorbiert werden.

$$L_p = \frac{3 \cdot 10^{-6}}{60 \cdot 2 \cdot \pi \cdot 0.001 \cdot 6 \cdot 760 \cdot 22.4 \cdot 10^{-3} \cdot 14.91} \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cm H}_2\text{O}} \right]$$

$$L_p \frac{R \cdot T}{\bar{V}_w} = P_f = L_p \cdot \frac{8.208 \cdot 10^{-2} \cdot 1000 \cdot 760 \cdot 14.19}{\text{Mol} \cdot K} \cdot 310/18.1$$

$$P_f = L_p \cdot 1.51606 \cdot 10^{-7}$$

$$P_f \approx 0.8 \text{ cm/sec (auswärts gerichtet)}$$

- B. Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit aus Daten von Perfusionen, wo sich über die perfundierte Strecke der osmotische Gradient und die Volumenstromstärke beständig ändern (Formel nach DuBois, Verniory und Abramov, 40)

$$\frac{P_f \cdot \bar{V}_w}{R \cdot T} = L_p = \frac{1}{R \cdot T \cdot F \cdot c_b^2} \left[c_b(\bar{V}_i - \bar{V}(x)) + c_i \cdot \bar{V}_i \cdot \left[\ln(c_b - c_i) \cdot \bar{V}_i - \ln(c_b \cdot \bar{V}(x) - c_i \cdot \bar{V}_i) \right] \right]$$

F: Wandfläche des Tubulussegmentes ($2\pi rL$), $r=0.001\text{cm}$

c_b : Osmolalität auf der basolateralen Seite

c_i : Osmolalität der Tubulusflüssigkeit zu Beginn des Segmentes

$\bar{V}_i$: Volumenstromstärke zu Beginn des Segmentes

$\bar{V}(x)$: Volumenstromstärke am Ende des Segmentes

1. Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit P_f , die erforderlich wäre, um eine um 17 mosmol/l hypertone Lösung, die mit 11.81 nl/min in ein 0.39 mm langes Segment infundiert wird, isoton werden zu lassen. Berechnet wird der spiegelbildliche Vorgang, da negative Zahlen nicht logarithmiert werden können.

$$c_i : 0.2962 \text{ mosmol/cm}^3$$

$$c_b : 0.314 \text{ mosmol/cm}^3$$

$$\dot{V}_i : 0.20866 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3/\text{sec}$$

$$\dot{V}(x) : (0.19683 - 0.206) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3/\text{sec}$$

$$F : 0.001 \cdot 2\pi \cdot 0.039 \text{ cm}^2$$

$\dot{V}(x) \cdot 10^{-6} \text{ [cm}^3/\text{sec}]$	$P_f \text{ [cm/sec]}$	$c(x) \text{ [mosmol/l]}$
0.206	0.038	310
0.204	0.065	307
0.202	0.122	304
0.200	0.192	301
0.198	0.335	298
0.197	0.610	296.4
0.1969	0.735	296.3

2. Berechnung der einwärts gerichteten hydraulischen Leitfähigkeit aus Bomsztyk und Wright (20)

Annahme: Der osmotische Ausgleich erfolgt nur durch Wassereinstrom, nicht aber durch Resorption von Natriumchlorid.

$$\dot{V}_i : 0.375 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3/\text{sec}$$

$$\dot{V}(x) : 0.3017 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3/\text{sec}$$

$$c_b : 0.375 \text{ mosmol/cm}^3$$

$$c_i : 0.300 \text{ mosmol/cm}^3$$

$$F : 0.001 \cdot 2 \cdot 0.21$$

$$P_f : 0.135 \text{ cm/sec}$$

Im unteren Diagramm von Abbildung 2 ist der Verlauf der Äquilibrierung eines osmotischen Gradienten in Abhängigkeit von der Größe der hydraulischen Leitfähigkeit dargestellt. Dies entspricht den Daten aus 6.1.11. B1.

(1) Agerup, B. (1975):

Influence of peritubular hydrostatic and oncotic pressures on fluid reabsorption in proximal tubules of the rat kidney.

ACTA PHYSIOL SCAND 93, 184-194.

(2) Alpern, R.J., Howlin, K.J., Preisig, P. (1985):

Active and passive components of chloride transport in the rat proximal tubule.

J CLIN INVEST 76: 1360-1366.

(3) Andreoli, T.E., Schafer, J.A. (1979):

Effective luminal hypotonicity - driving force for isotonic proximal tubular fluid absorption.

AJP 236(2):F89-F96.

(4) Andreoli, T.E., Schafer, J.A. (1978):

Volume absorption in the pars recta.

III. Luminal hypotonicity as a driving force for isotonic volume reabsorption.

AJP 234: F349-F355.

(5) Andreoli, T.E., Schafer, J.A., Patlak,

C.F. (1978):

Mechanisms for salt and water transport in the mammalian straight tubule.

In: Membrane Transport Processes, herausgegeben von Hoffmann, J.F.; Ravens Press.

(6) Andreoli, T.E., Schafer, J.H., Troutman, S.L.,

Watkins, M.L. (1979):

Solvent drag component of Cl-flux in superficial proximal straight tubules - evidence for a paracellular component of isotonic fluid absorption. AJP 237 (6):F455-F462.

(7) Atherton, J.C. (1977):

Comparison of chloride concentration and osmolality in proximal tubular fluid, peritubular capillary plasma and systemic plasma in the rat. J PHYSIOL 273, 765-773.

(8) Bank, N., Aynedjian, H.S. und Wada, T. (1972): Effect of peritubular capillary perfusion rate on proximal sodium reabsorption rate. KIDNEY INTERNATIONAL 1, 397-405.

(9) Barfuss, D.W., Schafer, J.A. (1981): Collection and analysis of absorbate from proximal straight tubules. AJP 241: F597-F604.

(10) Barratt, L.J., Rector, F.C., Kokko, J.P., Seldin, D.W. (1974): Factors governing transepithelial potential differences across proximal tubule of rat-kidney. J CLIN INVEST 53(2): 454

(11) Barratt, L.J., Rector, F.C. Jr., Kokko, J.P. und Seldin, D.W. (1970): Mechanisms of salt and water reabsorption in proximal convoluted tubule (PCT). PROCEEDINGS OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY 4:42 (Abstract).

(12) Barry, P.H. und Diamond, J.A. (1970): Junction potentials, electrode standard potentials and other problems in interpreting electrical properties of membrane. J MEMBR BIOL 3: 93-122.

(13) Berry, C.A. (1981):

Electrical effects of acidification in the rabbit proximal convoluted tubule.

AJP 240: F459-F470.

(14) Berry, C.A. (1983):

Lack of effect of peritubular protein on passive NaCl transport in the rabbit proximal convoluted tubule.

J CLIN INVEST 71, 268-281.

(15) Berry, C.A. (1983):

Water permeability and pathways in the proximal tubule.

AJP 245 (Renal Fluid Electrolyte Physiology 14): F279- F294.

(16) Berry, C.A., Cogan, M.G. (1981):

Influence of peritubular protein on solute absorption in the rabbit proximal tubule.

J CLIN INVEST 68, 506-516.

(17) Berry, C.A., Rector, F.C. (1980):

Active and passive sodium transport in the proximal tubule.

MINER ELECTROLYTE METABOL 4:149-160.

(18) Berry, C.A., Rector, F.C. (1978):

Relative sodium-to-chloride permeability in the proximal convoluted tubule.

AJP 235 (RFEP 4): F592-F604.

(19) Biagi, B.A., Giebisch, G. (1979):

Temperature-dependence of transepithelial potential in isolated perfused rabbit proximal tubules.

AJP 236(3):F302-F310.

(20) Bomsztyk, K., Wright, F.S. (1986):
Dependence of ion fluxes on fluid transport by rat
proximal tubule.
AJP 250: F 680- F689.

(21) Bomsztyk, K., Wright, F.S. (1982):
Effects of transepithelial fluid flux on
transepithelial voltage and transport of calcium,
sodium, chloride and potassium by the renal
proximal tubule. (Abstract)
KIDNEY INTERNATIONAL 21:269

(22) Boulpaep, E.L., Seely, J.F. (1971):
Electrophysiology of proximal and distal tubules
in autoperfused dog kidney.
AJP 221: 1084

(23) Burckhardt, B.Ch., Cassola, A.C., Fromter, E.
(1984):
Electrophysiological analysis of bicarbonate
permeation across the peritubular cell membrane of
rat kidney proximal tubule.
II. Exclusion of HCO_3^- -effects on other ion
permeabilities and of coupled electroneutral HCO_3^- -
transport.
PFLÜGERS ARCH 401:43-51.

(24) Burckhardt, B.Ch., Sato, K., Fromter, E.
(1984):
Electrophysiological analysis of bicarbonate
permeation across the peritubular cell membrane of
rat kidney proximal tubule.
I. Basic observations.
PFLÜGERS ARCH 401,34-42.

(25) Burg, M., Green, N. (1973):
Function of the thick ascending limb of Henle's
loop.
AJP 224:659-668.

- (26) Cala, P.M. (1983):
Cell volume regulation by Amphiuma red blood cells.
J GEN PHYSIOL 82, 761.
- (27) Cardinal, J., Laprade, R. (1983):
Liquid junctions and isolated proximal tubule
transepithelial potential.
AJP 244, F304 .
- (28) Cardinal, J., Lutz, M.D., Burg, M.B.,
Orloff, J. (1975):
Lack of relationship of potential difference to
fluid absorption in proximal renal tubule.
KIDNEY INT 7(2): 94-102.
- (29) Cassola, A.C., Mollenhauer, M., Frömter, E.
(1983):
The intracellular Cl activity of rat kidney proximal
tubular cells.
PFLÜGERS ARCH 399:259-265.
- (30) Chantrelle, B. und Rector, F.C. Jr. (1980):
Active and passive components of volume reabsorption
in rat superficial proximal convoluted tubules.
CLIN RES 28: 441 A.
- (31) Clapp, J.R., Watson, J.F. und Berliner, R.W.
(1963):
Osmolality, bicarbonate concentration and water
reabsorption in proximale tubule of dog nephron.
AJP, 295:273-280.
- (32) Corman, B., Carriere, S., Le Grimellec, C.,
Cardinal, J. (1980):
Proximal tubular response to variations in
extracellular sodium concentration.
AJP 238, F256.

- (33) Corman, B., DiStefano, A. (1983):
Does water drag solutes through kidney proximal tubule?
PFLÜGERS ARCH 397:35-41.
- (34) Cortney, M.A. (1969):
Renal tubular transfer of water and electrolytes in adrenalectomized rats.
AJP, 216:589-698.
- (35) Curran, P.F., Macintosh, J.R. (1962):
A Model for Biological Water Transport.
Nature 193, 347 .
- (36) Dellasaga, M. , Grantham, J.J. (1973):
Regulation of renal tubule cell volume in hypotonic media.
AJP 224: 1288-1294.
- (37) De Mello Aires, G., Lopes, A.G., Malnic, G. (1976):
Conductances, diffusion and streaming potentials in the proximal tubule.
J PHYSIOL 260, 553-569.
- (38) Diamond, J.M., Bossert, W.H. (1967):
Standing gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute in epithelia.
J GEN PHYSIOL 50: 2061.
- (39) Diamond, J.M. (1964):
The mechanism of isotonic water transport.
J GEN PHYSIOL 48:15.
- (40) Du Bois, R., Verniory, A., Abramov, M. (1976):
Computation of the osmotic water permeability of perfused tubule segments.
KIDNEY INT 10, 478-479.

(41) DuBose, T.D. Jr., Seldin, D.W. und Kokko, J.P.
(1978): Segmental chloride reabsorption in the rat
nephron as a function of load.
AJP 234 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 3):
F97-F105.

(42) Eldrup, E., Frideriksen, O. Møllgaard, K. und
Rostgaard, J. (1982):
Effects of a small serosal hydrostatic pressure
on sodium and water transport and morphology in
rabbit gallbladder.
J PHYSIOL 331, 67-85.

(43) Erik, A., Persson, G., Ågerup, B.,
Schnermann, J. (1972):
Effect of luminal application of colloids on
rat proximal tubular net fluid flux.
KIDNEY INT 2: 203-213.

(44) Ericson, A.C., Spring, K.R. (1982):
Volume regulation by Necturus gallbladder:
Apical Na-H and Cl-HCO₃ exchange.
AJP (Cell 12): C146-C150.

(45) Field, M. (1971):
Ion transport in rabbit ileal mucosa.
II. Effects of cyclic 3',5'-AMP.
AJP 221:992-997.

(46) Field, M., Plotkin, G.R. und Silen, W. (1968):
Effects of vasopressin, theophylline and cyclic
adenosin monophosphate on short-circuit-current
across isolated rabbit ileal mucosa.
NATURE 217:469-471.

(47) Frömter, E. (1982):

Electrophysiological analysis of rat renal sugar and amino acid transport.

PFLUGERS ARCH 393:179-189.

(48) Frömter, E. (1974):

Electrophysiology and isotonic fluid absorption of proximal tubules of mammalian kidney.

in: Kidney and Urinary Tract Physiology.

K. Thurnau, Herausgeber.

Butterworths Univ. Park Press, Baltimore, 1-38.

(49) Frömter, E. (1984):

Viewing the kidney through microelectrodes.

AJP 247 (RFEP 16):F695-F705.

(50) Frömter, E., Gessner, K. (1974):

Active transport potentials, membrane diffusion potentials and streaming potentials across rat kidney proximal tubule.

PFLUGERS ARCH 351 (1): 85

(51) Frömter, E., Gessner, K. (1974):

Free-flow potential profile along rat-kidney proximal tubule.

PFLUGERS ARCH 351 (1): 69

(52) Frömter, E., Gessner, K. (1975):

Effect of inhibitors and diuretics on electrical potential differences in rat-kidney proximal tubule.

PFLUGERS ARCH 357 (3-4): 209-224.

(53) Frömter, E., Lüer, K. (1973):

Free flow potential profile along rat proximal tubule.

PFLUGERS ARCH, 339, R47.

(54) Frömter, E., Müller, C.W., Wick, T. (1970):

Permeability properties of the proximal tubular

epithelium of the rat kidney studied with electrophysiological methods.

In: Electrophysiology of epithelial cells, G. Giebisch ed., 119-146, Stuttgart - NY, Schattauer 1971.

(55) Frömter, E., Rumrich, G. und Ullrich, K.J. (1973):

Phenomenological description of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- absorption from proximal tubules of the rat kidney.

PFLUEGERS ARCH 343, 189-220.

(56) Galla, J.H., Beaumont, J.E., Luke, R.G. (1977):

Effect of volume expansion with NaCl or NaHCO_3 on nephron fluid and Cl transport.

AJP 233 (Renal Fluid Electrolyte Physiol.2):

F118-F125.

(57) Gertz, K.H. (1963):

Transtubuläre Natriumchloridflüsse und Permeabilität für Nichteletrolyte im proximalen und distalen Tubulus der Rattenniere.

PFLUGERS ARCH 276:336.

(58) Gertz, K.H., Boylan, J.W. (1974):

Glomerular tubular balance.

In: Handbook of Physiology, Section 8 :

Renal Physiology (J. Orloff und R.W. Berliner, eds.), pp. 763-790. Washington DC.

(59) Giebisch, G. (1978):

The proximal nephron.

In: Physiology of membrane disorders.

Andreoli, T.E., Hoffman, J.E., Fanestil, D.D., eds.

Plenum Medical Book Company, NY, London.

(60) Giebisch, G., Sullivan, L.P., Whitembury, G.
(1973):

Relationship between tubular net sodium reabsorption
and peritubular potassium uptake in the perfused
Necturus kidney.

J PHYSIOL , 230:51-74.

(61) Gottschalk, C.W.(1963):

Renal tubular function:

Lessons from micropuncture.

Harvey Lect., 58: 99-124.

(62) Grantham, J.J., Lowe, C.M., Dellasaga, M. und
Cole, B.R. (1977):

Effect of hypotonic medium on K and Na content
of proximal renal tubules.

AJP 232:F42-F49.

(63) Green, R., Giebisch, G. (1984):

Luminal hypotonicity: a driving force for fluid
absorption from the proximal tubule.

AJP 246 (RFEF 15):F167-F174.

(64) Green, R., Moriarty, R.J., Giebisch, G.
(1981):

Ionic requirements of proximal tubular fluid
reabsorption: flow dependence of fluid transport.
KIDNEY INT 20: 590-587.

(65) Green, R., Bishop, J.H.V. und Giebisch, G.
(1979):

Ionic requirements of proximal tubular sodium
transport.

III. Selective luminal anion substitution.

AJP, 236 (Renal Fluid Electrolyte Physiology, 5):
F268-F277.

(66) Green, R., Windhager, E.E., Giebisch, G.(1974):
Protein oncotic pressure effects on proximal

tubular fluid movement in the rat.

AJP 226:365-276.

(67) Györy, A.Z., Brendel, U., Kinne, R. (1972):
Effect of cardiac glykosides and sodium ethacrylate
on transepithelial sodium transport in in vivo
micropuncture experiments and on isolated plasma
membrane Na/K-ATPase in vitro in the rat.
PFLÜGERS ARCH 335:287-296.

(68) Györy, A.Z., Lingard, J.M., Young, J.A. (1974):
Cardiac glykoside inhibition of active sodium
transport in rat proximal tubules: evidence for a
multiple allosteric system.
PROC AUSTRALIAN PHYSIOL PHARMACOL SOC 5:208-210.

(69) Häberle, D.A. (1980):
Die luminale Kontrolle der isotonen Resorption im
proximalen Tubulus der Rattenniere.
Ein Elementarmechanismus der glomerulotubulären
Balance.
Habilitationsschrift.

(70) Häberle, D.A., v. Baeyer, H. (1983):
Characteristics of glomerulotubular balance.
AJP 244 (Renal Fluid Electrolyte Physiology):
F 355-F366.

(71) Häberle, D.A., Davis, J.M. (1985):
Regulation of proximal tubular fluid absorption in
the rat kidney.
PFLÜGERS ARCH 405 :S131- S135.

(72) Häberle, D.A., Müller, U., Frankenberger, M.,
Nagel, W. (1984):
Dependency of transepithelial proximal tubular
potential (PD) upon fluid transport rate.
PFLÜGERS ARCH 400: R21.

(73) Hebert, S.C., Schafer, J.A., Andreoli, T.E.
(1981):

Principles of membrane transport.

In: Brenner, B., Rector, F.C., ed., "The Kidney",
116-141.

Saunders, Philadelphia, London, Toronto.

(74) Hierholzer, K., Kawamura, S., Seldin, D.W.,
Kokko, J. P. und Jacobson, H.R.(1980):

Reflexion coefficients of various substrates across
superficial and juxtamedullary proximal convoluted
segments of rabbit nephrons.

MINERAL ELECTROLYTE METAB, 3:172-180.

(75) Higashikara, E., Stokes, J.B., Kokko, J.P.,
Campbell, W.B. und DuBose, T.D. Jr. (1979):

Cortical and papillary micropuncture examination of
chloride transport in segments of the rat kidney
during inhibition of prostaglandin production.

J CLIN INVEST, 64:1277-1287.

(76) Hoffmann, E.K., Sjolom, C., Simonsen, L.O.
(1981):

Anion-cation cotransport and volume regulation in
Ehrlich ascites tumour cells.

J PHYSIOL 296:61-84.

(77) Hogben, C.A.M. (1965):

Introduction: the natural history of the isolated
bullfrog gastric mucosa.

FED PROC 24:1353-1359.

(78) Howlin KJ, Alpern RJ, Berry CA, Rector FC Jr
(1986):

Evidence for electroneutral sodium chloride
transport in rat proximal convoluted tubule.

AJP 250: F644- F648.

(79) Jacobson, H.R. (1979):

Characteristics of volume reabsorption in rabbit superficial and juxtamedullary proximal convoluted tubule.

J CLIN INVEST, 63:410-418.

(80) Jacobson, H.R., Kokko, J.P., Seldin, D.W. und Hohnberg C. (1982):

Lack of solvent drag of NaCl and NaHCO₃ in rabbit proximal tubules.

AJP 243 (Renal Fluid Electrolyte Physiology 12):

F 342 - F 348.

(81) Kashgarian, M., Warren, Y. und Levitin, H.

(1965):

Micropuncture study of proximal renal tubular chloride transport during hypercapnea in the rat.

AJP 209:655-658.

(82) Kawamura S, Imai M, Seldin DW, Kokko JP (1975):

Characteristics of salt and water transport in superficial and juxtamedullary straight segments of proximal tubule.

J CLIN INVEST 55 (6): 1269-1277.

(83) Keidel, W.D. (1979):

Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie, 5. Auflage.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

(84) Kokko, J.P., Rector, F.C. Jr. und Seldin, D.W.

(1970):

Mechanisms of salt and water reabsorption in proximal convoluted tubule (PCT).

Proceedings of the American Society of Nephrology 4:42 (Abstract).

(85) Kregenow, F.M. (1981): Osmoregulatory salt transporting mechanisms: Control of cell volume in anisotonic media.

ANN REV PHYSIOL 43:493-505.

(86) Kunan, R.T. Jr. (1972): The influence of the carbonic anhydrase inhibitor, benzolamide (CL 11,366), on the reabsorption of chloride, sodium and bicarbonate in the proximal tubule of the rat.

J CLIN INVEST 51:294-306.

(87) Lang, F., Quehenberger, P., Greger, R., Silbernagl, S., Stocking, P. (1980):

Evidence for a bicarbonate leak in the proximal tubule of the rat-kidney.

PFLUGERS ARCH 386(3):239-244.

(88) Le Grimellec, C. (1975): Micropuncture study along the proximal convoluted tubule: electrolyte reabsorption in the first convolutions.

PFLUEGERS ARCH 354:133-150.

(89) Litchfield, J.B. und Bott, P.A. (1962):

Micropuncture study of renal excretion of water, K, Na, and Cl in the rat.

AJP 203:667-670.

(90) Liu, F.Y., Cogan, M.G., Rector, F.C. (1984):

Axial heterogeneity in the rat proximal convoluted tubule.

II. Osmolality and osmotic water permeability.

AJP 247:F822-F826.

(91) Lucci, M.S. und Warnock, D.G. (1979):

Effects of anion-transport inhibitors on NaCl reabsorption in the rat superficial proximal convoluted tubule.

J CLIN INVEST, 64:570-579.

(92) Macknight, A.C., DiBona, D.R., Leaf, A. (1980):
Sodium transport across toad urinary bladder:
A Model "tight" epithelium.
PHYSIOL REV 60, 615-715.

(93) Mac Robbie, E.A.C., Ussing, H.H. (1961):
Osmotic behaviour of the epithelial cell of
frog skin.
ACTA PHYSIOL SCAND 53:348-365.

(94) Malnic, G., De Mello Aires, M. und Vieira, F.
(1970):
Chloride excretion in nephrons of rat kidney
during alterations of acid-base equilibrium.
AJP 218:20-26.

(95) Marchand, G.R., OH, C.E., Cuche, J.L. und Knox,
F.G. (1976):
Comparison of proximal tubule fluid-to-
plasma ultrafiltrate chloride ratio in rats and
dogs.
A APPL PHYSIOL 4:1009-1011.

(96) Maude, D.L. (1969):
Effects of K and ouabain on fluid transport and
cell Na in proximal tubules in vitro.
AJP 210:1199-1206.

(97) Maude, D.L. (1970):
Mechanism of salt transport and some permeability
properties of rat proximal tubule in vitro.
AJP 218:1590-1595.

(98) Morel, I.I., Murayama, Y. (1970):
Simultaneous measurement of unidirectional and net
sodium fluxes in microperfused rat proximal tubules.
PFLÜGERS ARCH 320, 1-23.

- (99) Munch, B.G. (1972):
Effects of sugar and amino acid transport on
transepithelial fluxes of sodium and chloride of
short circuit rat jejunum.
J PHYSIOL, 223:699-717.
- (100) Neufeld, T., Terreros, D., Grantham, J. (1983):
Critical role of calcium in the regulation of
intracellular volume of isolated proximal S2
renal tubules in hypotonic medium.
KIDNEY INTERNATIONAL 23, 255.
- (101) Neumann, K.H., Rector, F.C. Jr. (1976):
Mechanisms of NaCl and water reabsorption in
the proximal convoluted tubule of rat kidney.
J CLIN INVEST 58:1110-1118.
- (102) Palant, C.E., Duffey, M.E., Mookerjee, B.K.,
Ho, S., Bentzel, C.J. (1983):
Ca²⁺ regulation of tight-junction permeability and
structure in Necturus gallbladder.
AJP 245, C 203.
- (103) Persson, B.E., Spring, K.R. (1982):
Gallbladder epithelial cell hydraulic water
permeability and volume regulation.
J GEN PHYSIOL 79:481-505.
- (104) Preisig, P.A., Berry, C.A. (1984):
Pathway of transepithelial osmotic water-flow
in the rat proximal convoluted tubule (PCT).
KIDNEY INT 25(1):313.
- (105) Proverbio, F., Condrescu-Guidi, M.,
Whittembury, G. (1975):
Ouabain-insensitive Na⁺ stimulation of an Mg²⁺ -
dependent ATPase in kidney tissue.
BIOCHIM BIOPHY ACTA 394:281-292.

- (106) Proverbio, F., Robinson, J.W.L.,
Whittembury, G. (1970):
Sensitivities of Na/K-ATPase and Na
extrusion mechanisms to ouabain and etacrynic acid
in the guinea-pig kidney cortex.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 211:327-336.
- (107) Ramsay, Brown (1965):
Simplified apparatus and procedure for freezing
point determination upon small volumes of fluid.
J SCIEN INSTRUM 32, 372.
- (108) Rector, F.C. Jr., Berry, C.A. (1978):
Preliminary studies on the characterization of the
paracellular pathway of proximal convoluted tubules.
In: New aspects of Renal Function, edited by H.G.
Vogel and K.J. Ullrich.
Amsterdam: Excerpta Medica, p.37-41.
(Workshop conference Hoechst).
- (109) Rector, F.C. Jr., Martinez-Maldonado, M.,
Brunner, F.P. und Seldin, D.W. (1966):
Evidence for passive reabsorption of NaCl in the
proximal tubule of the rat kidney.
J CLIN INVEST 45:1060 (Abstr.)
- (110) Robinson RA, Stokes RH (1959):
Electrolyte solutions
Butterworths , London
- (111) Rocha, A.S., Kokko, J.P. (1973):
Sodium chloride and water transport in the
medullary thick ascending limb of Henle.
Evidence for active chloride transport.
J CLIN INVEST 52:612-623.

(112) Sackin, H., Boulpaep, E.L. (1975):
Models for coupling of salt and water transport:
proximal tubular reabsorption in *Necturus* kidney.
J GEN PHYSIOL 66: 671-733.

(113) Sato, K. (1976):
Reevaluation of micropuncture techniques: Some of
the factors which affect the rate of fluid
absorption by the proximal tubule.
In: Biochemical Aspects of Renal Function,
Herausgeber Angielski und Dubach, Huber Verlag,
Bern, pp. 175-187.

(114) Schafer, J.A. (1984):
Mechanisms coupling the absorption of salt and
water in the proximal nephron.
KIDNEY INT 25:708-716.

(115) Schafer, J.A., Barfuss, D.W. (1984):
Rate of formation and composition of absorbate
from proximal nephron segments.
AJP 247:F117-F129.

(116) Schafer, J.A., Patlak, C.S., Andreoli, T.E.
(1975):
Component of fluid absorption linked to passive ion
flows in superficial pars recta.
J GEN PHYSIOL 66(4):445-471.

(117) Schafer, J.A., Patlak, C.S., Andreoli, T.E.
(1975):
Fluid absorption and active and passive ion flows in
rabbit superficial pars recta.
AJP 233 (2):F154-F167.

- (118) Schafer JA, Troutman SL, Andreoli TE (1974):
Volume reabsorption, transepithelial potential
differences and ionic permeability properties in
mammalian superficial proximal straight tubule.
J GEN PHYSIOL 64: 582-607.
- (119) Seely JF, Boulpaep E (1971):
Renal function studies on isobaric autoperfused dog
kidney.
AJP 221: 1075-1083.
- (120) Seely, J.F., Chirito, E. (1975):
Studies of the electrical potential difference in
rat proximal tubule.
AJP 229:72-80.
- (121) Spring, K.A., Ericson, A.Ch. (1982):
Epithelial cell volume modulation and regulation.
J MEMBR BIO 69:167-176.
- (122) Spring, K.R. (1983):
Fluid transport by gall bladder epithelium.
J EXP BIOL 106:181-194.
- (123) Spring, K.R., Hope, A. (1978):
Size and shape of the lateral intercellular
spaces in living epithelium.
SCIENCE, 200,54-58.
- (124) Spring, K.R., Hope, A., Persson, B.E. (1981):
Quantitative light microscopic studies of epithelial
fluid transport.
In: Water transport across epithelia.
Herausgeber: Ussing, H.H., Bindsley, N., Lassen,
N.A., und Sten-Knudsen, O.. pp 190-205.
Munksgaard, Copenhagen.
- (125) Spring, K.R., Persson, B.E. (1981):
Quantitative light microscopy and epithelial

function.

In: Epithelial ion and water transport.

Herausgeber: Macknight, A.D.C. und Leadov, J.P.

pp 15-21. Raven Press, New York.

(126) Toretti, J., Hendler, E., Weinstein, E.,

Longnecker, R.F., Epstein, F.H. (1972):

Functional significance of Na/K-ATPase in the kidney: effects of ouabain inhibition.

AJP 222: 1398-1405.

(127) Ullrich, K.J., Rumrich, G., Fuchs, G. (1964):

Wasserpermeabilität und transtubulärer Wasserfluß

corticaler Nephronabschnitte bei verschiedenen

Diuresezuständen.

PFLÜGERS ARCH 280: 99.

(128) Vari, R.C., OH, C.E. (1982):

In vivo proximal tubular fluid-to-plasma chloride concentration gradient in the rabbit.

AJP 242 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 11):

F575-F579.

(129) Walker, A.M., Bott, P.A., Oliver, J.,

MacDowell, M.C. (1941):

The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney.

AJP 134: 580-595.

(130) Warner, R.R., Strunk, T., Lechene, C. (1975):

Analysis of proximal tubule salt and water transport in standing droplets.

J THEOR BIO 77(4):453-471.

(131) Warnock, D.G., Burg, M.B. (1977):

Urinary acidification : CO₂ transport by the rabbit proximal straight tubule.

AJP 232: F20-F25.

(132) Warnock, D.G., Eveloff, J. (1982):

NaCl entry mechanism in the luminal membrane of the renal tubule.

AJP 242 (RFEP 11): F561-F574.

(133) Weinstein, S.W. (1968):

Micropuncture study of renal tubular transfer of sodium chloride in the rat.

AJP 214:222-227.

(134) Weinstein, A.M., Stephenson, J.L. (1979):

Electrolyte transport across a simple epithelium. Steady-state and transient analysis.

BIOPHYSICAL J 27,165-186.

(135) Weinstein, A.M., Stephenson, J.L. (1981):

Models of coupled salt and water transport across leaky epithelia.

J MEMBR BIO 60, 1-20.

(136) Welling, P.A., Linshaw, M.A. (1984):

Critical role of Cl⁻ in hypotonic cell volume regulation of proximal straight tubules (PST).

KIDNEY INTERNATIONAL 25,320.

(137) Welling, L.W., Welling, D.J., Ochs, T.J.

(1987):

Video measurement of basolateral NaCl reflection coefficient in proximal tubule.

AJP 250:F290-F298.

(138) Whitlock, R.T., Wheeler, H.O. (1964):

Coupled transport of solute and water across rabbit gallbladder epithelium.

J CLIN INVEST 43:2249-2265.

(139) Williams, J.C., Barfuss, D.W., Schafer, J.A.

(1986):

Transport of solutes in proximal tubules is modified

by changes in medium osmolality.

AJP 250: F246-F255.

(140) Whitttembury, G., Grantham, J.J. (1976):
Cellular aspects of renal sodium transport and cell
volume regulation.

KIDNEY INTERN 9:103-120.

(141) Whitttembury, G. (1985):
Mechanism of Epithelial Solute-Solvent Coupling.
In: The Kidney, Seldin, D.W., Giebisch, G., eds.
Chapter 11.

(142) Whitttembury, G., Proverbio, F. (1970):
Two modes of Na extrusion in cells from guinea-
pig kidney cortex slices.

PFLÜGERS ARCH 316:1-25.

(143) Windhager, E.E., Giebisch, G. (1961):
Micropuncture study of renal tubular transfer of
sodium chloride in the rat.

AJP 200:581-590.

(144) Yoshitomi, K., Frömter, E. (1984):
Cell pH of rat renal proximal tubule in vivo and the
conductive nature of peritubular HCO_3^- (OH^-) exit.

PFLÜGERS ARCH 402: 300-305.

(145) Zar, J.H. (1981):
Power of statistical testing:
Hypotheses about means.

AMERICAN LABORATORY, 6/81, 102-107.

Danksagung

Herrn Professor Thureau möchte ich für die intensive Förderung meines Interesses an der Physiologie, die Aufnahme an sein Institut und die vielen wertvollen Anregungen sehr herzlich danken.

Für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und außergewöhnlich lehrreiche Zusammenarbeit danke ich Herrn Privatdozent Dr. Häberle und Herrn Dr. Davis. Mein Dank gilt Herrn Dr. Häberle vor allem für die Überlassung des Themas der Arbeit und die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Bewertung der Experimente.

Herrn Professor Nagel möchte ich für die Mitbenutzung des von ihm entwickelten Potentialmeßgeräts und die sehr hilfreiche Unterstützung bei technischen Schwierigkeiten danken.

Frau Schmitt danke ich für ihre freundliche Anleitung und Hilfe zur Anfertigung der Kapillarelektroden .

Lebenslauf

- 14.6.61 geboren in Sonthofen im Oberallgäu als
Tochter des Tierarztes Dr. Friedrich Müller
und seiner Frau Waltraud
- 1967-71 Besuch der Grundschule in Sonthofen
- 1971-80 Besuch des Gymnasiums Sonthofen
- 1980 Abitur, Aufnahme in die Stiftung
Maximilianeum
- 11/80 Immatrikulation an der LMU München
für die Fächer Humanmedizin/Deutsche
Philologie
- 1981 Aufnahme in die Studienstiftung des
Deutschen Volkes
- 1982 Praktikantin am MPI für Biochemie,
Martinsried
- seit 1983 Doktorantin am Physiologischen Institut,
Lehrstuhl Prof. Dr.med. K. Thureau, im Labor
von Priv.Do. Dr.med. D.A. Häberle
- 1984 elective student an der Oxford Medical
School
- 1985-86 PJ- Student in den Abteilungen Neurologie
und Chirurgie des Klinikums Großhadern und
an der Harvard Medical School
- 7/86 Amerikanisches Staatsexamen
- 11/86 Deutsches Staatsexamen
- seit 1.4.87 Wissenschaftliche Assistentin an der
Medizinischen Poliklinik der LMU
(Direktor: Prof. Dr.med. N. Zöllner)

1. The first of the three is the
the second of the three is the
the third of the three is the
the fourth of the three is the
the fifth of the three is the
the sixth of the three is the
the seventh of the three is the
the eighth of the three is the
the ninth of the three is the
the tenth of the three is the
the eleventh of the three is the
the twelfth of the three is the
the thirteenth of the three is the
the fourteenth of the three is the
the fifteenth of the three is the
the sixteenth of the three is the
the seventeenth of the three is the
the eighteenth of the three is the
the nineteenth of the three is the
the twentieth of the three is the
the twenty-first of the three is the
the twenty-second of the three is the
the twenty-third of the three is the
the twenty-fourth of the three is the
the twenty-fifth of the three is the
the twenty-sixth of the three is the
the twenty-seventh of the three is the
the twenty-eighth of the three is the
the twenty-ninth of the three is the
the thirtieth of the three is the
the thirty-first of the three is the
the thirty-second of the three is the
the thirty-third of the three is the
the thirty-fourth of the three is the
the thirty-fifth of the three is the
the thirty-sixth of the three is the
the thirty-seventh of the three is the
the thirty-eighth of the three is the
the thirty-ninth of the three is the
the fortieth of the three is the
the forty-first of the three is the
the forty-second of the three is the
the forty-third of the three is the
the forty-fourth of the three is the
the forty-fifth of the three is the
the forty-sixth of the three is the
the forty-seventh of the three is the
the forty-eighth of the three is the
the forty-ninth of the three is the
the fiftieth of the three is the
the fifty-first of the three is the
the fifty-second of the three is the
the fifty-third of the three is the
the fifty-fourth of the three is the
the fifty-fifth of the three is the
the fifty-sixth of the three is the
the fifty-seventh of the three is the
the fifty-eighth of the three is the
the fifty-ninth of the three is the
the sixtieth of the three is the
the sixty-first of the three is the
the sixty-second of the three is the
the sixty-third of the three is the
the sixty-fourth of the three is the
the sixty-fifth of the three is the
the sixty-sixth of the three is the
the sixty-seventh of the three is the
the sixty-eighth of the three is the
the sixty-ninth of the three is the
the seventieth of the three is the
the seventy-first of the three is the
the seventy-second of the three is the
the seventy-third of the three is the
the seventy-fourth of the three is the
the seventy-fifth of the three is the
the seventy-sixth of the three is the
the seventy-seventh of the three is the
the seventy-eighth of the three is the
the seventy-ninth of the three is the
the eightieth of the three is the
the eighty-first of the three is the
the eighty-second of the three is the
the eighty-third of the three is the
the eighty-fourth of the three is the
the eighty-fifth of the three is the
the eighty-sixth of the three is the
the eighty-seventh of the three is the
the eighty-eighth of the three is the
the eighty-ninth of the three is the
the ninetieth of the three is the
the ninety-first of the three is the
the ninety-second of the three is the
the ninety-third of the three is the
the ninety-fourth of the three is the
the ninety-fifth of the three is the
the ninety-sixth of the three is the
the ninety-seventh of the three is the
the ninety-eighth of the three is the
the ninety-ninth of the three is the
the hundredth of the three is the

